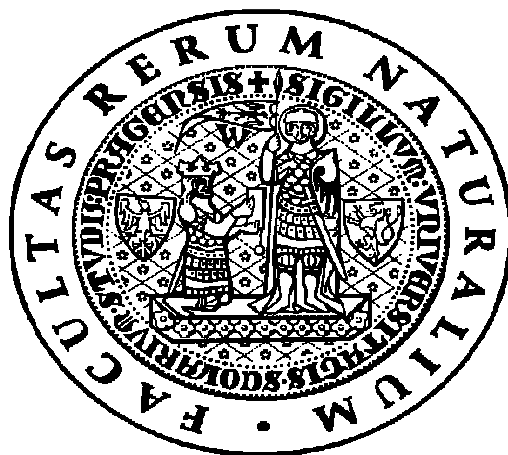


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium metabolismu vzdušných polutantů
a mutagenů 3-nitrobenzanthronu
a 2-nitrobenzanthronu**

Diplomová práce

Study of metabolism air pollutants and mutagens 3-nitrobenzanthrone and
2-nitrobenzanthrone

Školitelka: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2012

Tereza Čechová

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Tereza Čechová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, všestrannou pomoc a laskavý přístup při vypracovávání této práce.

Dále děkuji RNDr. Michaele Moserové a celému kolektivu laboratoře za potřebné rady, pomoc a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Práce byla vypracována jako součást řešení grantů GAČR (P503/11/0163) a UK (UNCE#42)

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT	8
ABSTRACT.....	9
1. ÚVOD.....	10
1.1 Nádorová onemocnění	10
1.1.1 Léčba nádorových onemocnění	11
1.1.2 Faktory způsobující a ovlivňující nádorová onemocnění	11
1.2 Karcinogeneze.....	13
1.1.3 Proces karcinogeneze.....	14
1.3 Biotransformace xenobiotik.....	15
1.3.1 I. fáze biotransformace xenobiotik	17
1.3.2 II. fáze biotransformace xenobiotik	18
1.4 Mikrosomální monooxygenasový systém	20
1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa	21
1.4.2 Cytochrom P450	24
1.4.2.1 Struktura cytochromu P450	24
1.4.2.2 Monooxygenasová reakce cytochromu P450	25
1.4.2.3 Nomenklatura cytochromu P450	28
1.4.2.4 Formy cytochromů P450.....	28
1.4.2.5 Genetický polymorfismus.....	30
1.4.2.6 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu.....	31
1.4.2.7 Substrátová specifita	32
1.5 Aromatické nitrosloučeniny.....	34
1.5.1 Významné nitroaromáty.....	34
1.6 3 – Nitrobenzanthron	38
1.6.1 Metabolismus 3-NBA	39
1.7 2 – Nitrobenzanthron	42
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	44
3 MATERIÁL A METODY	45
3.1 Materiál a chemikálie.....	45
3.2 Přístroje	46
3.3 Metody	47
3.3.1 Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně potkanů	47
3.3.2 Metody používané ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA	48
3.3.2.1 Metody používané ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA za aerobních podmínek.....	49
3.3.2.2 Metody používané ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA za anaerobních podmínek	50
3.3.3 Příprava standardního roztoku 3-ABA pro HPLC.....	50
3.3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	50
3.3.5 Kalibrační křivka standardu 3-ABA	51
3.3.6 Aktivace 3-NBA a 2-NBA za tvorby aduktů s DNA.....	52
4 VÝSLEDKY	53
4.1 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů. 53	
4.1.1 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních podmínek.....	53

4.1.1.1	Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) za anaerobních podmínek.....	54
4.1.2	Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za aerobních podmínek	57
4.1.2.1	Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) za aerobních podmínek.....	57
4.1.3	Charakterizace oxidačních a redukčních metabolitů 3-NBA detekovaných v experimentech s jaterními mikrosomálními systémy potkanů	61
4.2	Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů. 63	
4.2.1	Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních podmínek.....	63
4.2.2	Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za aerobních podmínek	65
4.3	Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší.....	66
4.3.1	Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za anaerobních podmínek.	67
4.3.1.1	Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních myší a myší s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy za anaerobních podmínek67	
4.3.2	Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za aerobních podmínek	69
4.3.2.1	Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních myší a myší s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy za aerobních podmínek69	
4.3.3	Kvantifikace detekovaného metabolitu 3-NBA – 3-ABA v experimentech s jaterními mikrosomálními systémy myší.....	71
4.4	Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší.....	72
4.4.1	Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za anaerobních podmínek	72
4.4.2	Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za aerobních podmínek	74
4.5	Studium aktivace 3-NBA a 2-NBA jaterními mikrosomy potkanů a myší... 76	
4.5.1	Jaterní mikrosomy potkanů aktivují 3-NBA za tvorby aduktů s DNA.. 76	
4.5.2	Jaterní mikrosomy myší aktivují 3-NBA za tvorby aduktů s DNA..... 78	
4.5.3	Studium aktivace 2-NBA jaterními mikrosomy potkanů a myší..... 78	
5	DISKUSE.....	79
6	ZÁVĚR	84
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3-ABA	3-aminobenzanthron
3-NBA	3-nitrobenzanthron
Abl	onkogen
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
B(a)P	benzo(a)pyren
HS-CoA	koenzym A
COX	cyklooxygenasa
CYP	cytochrom P450
dA- <i>N</i> ⁶ -ABA	2-(2'-deoxyadenosin- <i>N</i> ⁶ -yl)-3-aminobenzanthron
dG-C8- <i>N</i> -ABA	<i>N</i> -(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dG- <i>N</i> ² -ABA	<i>N</i> -(2'-deoxyguanosin- <i>N</i> ² -yl)-3-aminobenzanthron
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Erb B	onkogen
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
/FADH [•] /FADH ₂	/semichinoidní radikál/hydrochinon
Fes	onkogen
FMN	flavinmononukleotid (chinoidní forma)
/FMNH [•] /FMNH ₂	/semichinoidní radikál/hydrochinon
Fos	onkogen
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion (γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin)
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (high-pressure liquid chromatography)
HRP	křenová peroxidasa
Jun	onkogen
LPO	laktoperoxidasa
MFO systém	systém monooxygenas (oxidas) se smíšenou funkcí („Mixed Function Oxidases“)
Mos	onkogen
MPO	myeloperoxidasa

mRNA	messenger RNA
Myb	onkogen
Myc	onkogen
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAT1, NAT2	<i>N,O</i> -acetyltransferasa 1,2
nitro-PAH	nitro-polycyklické aromatické uhlovodíky
N-OH-ABA	N-hydroxy-3-aminobenzanthron
NQO1	NADPH:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)
p.p.m.	miliontina z celku (parts per milion)
P21	protein kódovaný genem <i>p21</i>
<i>p21</i>	tumor-supresorový gen
<i>p53</i>	tumor-supresorový gen
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAPS	3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát
PB	fenobarbital
PCN	pregnenolon 16 α -karbonitrilem
PHS	prostaglandin H synthasa
POR	NADPH:cytochrom P450 reduktasa
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	pregname X receptor
Raf	onkogen
Ras	onkogen
Rel	onkogen
Sis	onkogen
Src	onkogen
SULT1A1, SULT1A2	sulfotransferasa 1,2
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
UDP	uridindifosfát
UDP-GT	uridyldifosfo-glukonosyltransferasa
XO	xanthinoxidasa
β -NF	β -naftoflavon

ABSTRAKT

Aromatické nitrosloučeniny jsou látky přítomné ve všech složkách životního prostředí. Jsou považovány za jeho toxické a karcinogenní kontaminanty. Většina nitroaromátů vykazuje v bakteriálních a savčích systémech mutagenní aktivitu. Existují karcinogeny vyvolávající nádorové procesy, především v játrech, plicích a prsních žlázách.

3-Nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) je jednou z polycyklických aromatických nitrosloučenin s vysokými toxickými účinky. 3-NBA se vyskytuje ve složkách životního prostředí a je přítomný i ve výfukových plynech, byl také detekován v půdě a jeho výskyt byl prokázán i v dešťové vodě. 2-Nitrobenzanthron (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) je izomerem 3-NBA nalezeným jako polutant znečištěného ovzduší. I když je 2-NBA látkou slabě toxickou, jeho vysoká koncentrace v ovzduší by mohla představovat vysoké zdravotní riziko pro lidskou populaci. Diplomová práce rozšiřuje poznatky o metabolismu 3-NBA a jeho izomeru 2-NBA za anaerobních a aerobních podmínek. Ke studiu metabolismu těchto látek byly využívány jaterní mikrosomální systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450 - CYP) a potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN), látek, které indukují CYP 1A, 2B, 2E1 a 3A. Dále se prováděly experimenty používající jaterní mikrosomální systémy myší jednak kontrolních („Wild Type“ - WT) a jednak geneticky modifikovaných „knock-out“, u kterých v játrech absentovala NADPH:CYP reduktasa („Hepatic Reductase Null“ - HRN). V obou případech jsme k separaci metabolitů vzniklých redukcí nebo oxidací 3-NBA (2-NBA) využili metodou HPLC (vysokotlaká kapalinová chromatografie). V práci byly také prováděny experimenty sledující aktivaci 3-NBA za anaerobních podmínek. Adukty vzniklé aktivací 3-NBA analogickými mikrosomálními systémy byly detekovány a kvantifikovány metodou „³²P-postlabeling“.

Klíčová slova: 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron, 3-aminobenzanthron, cytochrom P450, NADPH:cytochrom P450 reduktasa, mutagenita, karcinogenita, vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC), DNA adukty, „³²P-postlabelling“.

ABSTRACT

Nitroaromatic compounds are mutagenic and carcinogenic substances present in environment. Most of nitroaromatic compounds are potent mutagens in bacterial and mammalian systems. They are also carcinogens causing development of tumors, primarily in the liver, lung and mammary glands.

3-Nitrobenzanthrone (3-NBA, 3-nitro-7H-benz [de] anthracene-7-one) is one of the polycyclic aromatic nitro compounds possessing high toxic effects. 3-NBA is an environmental pollutant present in diesel exhaust and was also detected in soil and in rain water. 2-Nitrobenzanthrone (2-NBA, 2-nitro-7H-benz [de] anthracene-7-one) is an isomer 3-NBA, which also occurs as a pollutant in air. Although the 2-NBA is a weakly toxic substance, its high abundance in air could exhibit a high health risk to humans. This thesis investigates the metabolism of 3-NBA and its isomeric derivate, isomer 2-NBA, under anaerobic and aerobic conditions. To study the metabolism of these compounds, microsomal systems isolated from the liver of rats pretreated with Sudanem I, β -naphthoflavone, phenobarbital, ethanol and pregnenolon 16 α -carbonitrile (PCN), the inducers of cytochromes P450 1A, 2B, 2E1 and 3A, were used. We also used mouse models, a control mouse line (wild type WT) and mice with deleted gene of NADPH:CYP reductase in the liver, thus absenting this enzyme in their livers (HRN). HPLC separation of metabolites formed of 3-NBA (2-NBA) was utilized in a study of 3-NBA and 2-NBA metabolism. We also performed the experiments, in which 3-NBA was activated under anaerobic conditions. The same microsomal systems were used for these experiments. The ^{32}P -postlabeling technique, to detect and quantifate DNA adducts generated by 3-NBA, was used. (In Czech)

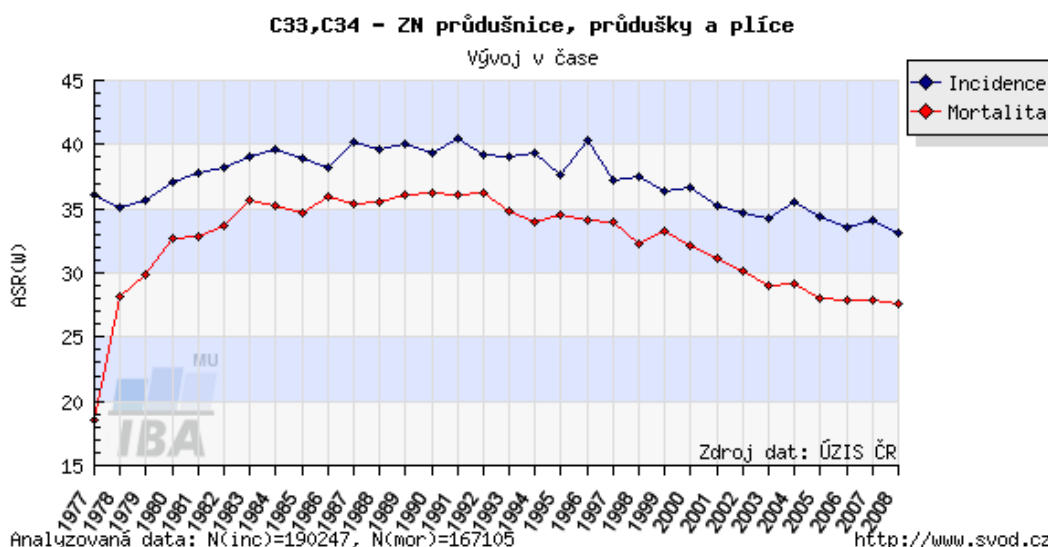
Keywords: 3-nitrobenzanthrone, 2-nitrobenzanthrone, 3-aminobenzanthrone, cytochrome P450, NADPH:cytochrome P450 reductase, mutagenicity, carcinogenesis, high-pressure liquid chromatography (HPLC) DNA adducts, ^{32}P -postlabelling.

1. ÚVOD

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou v ekonomicky vyspělých státech druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách. V České republice představují asi čtvrtinu všech úmrtí. [Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2010]

V roce 2008 bylo v Národním onkologickém registru ČR registrováno přes 77 tisíc případů nádorových onemocnění (39 tisíc případů u mužů a 38 tisíc u žen). Počet nově zjištěných zhoubných nádorů na 100 tisíc obyvatel meziročně mírně vzrostl o necelá 2%. Nejčastěji hlášeným nádorovým onemocněním v roce 2008 byla rakovina kůže, poté nádor prostaty u mužů a prsu u žen. Nejvyšší úmrtností se v roce 2008 vyznačoval zhoubný nádor plic (**Obr. 1**) u mužů a prsu u žen. [Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2010]



Obr. 1 Časový vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 tisíc osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 tisíc osob) pro zvolenou diagnózu v celé populaci. [http://www.svod.cz]

Nádor (tumor, novotvar, neoplasma) je nová tkáň, vznikající nadměrným a organismem nekontrolovatelným růstem. Komplexní proces vzniku nádorů se nazývá **karcinogeneze**. (viz kap.1.2) [Stiborová, 2005]

Nádory dělíme na **benigní** – nezhoubné a **maligní** - zhoubné. Benigní nádory jsou často ohraničené a nepronikají do jiných tkání, proto je lze většinou snadno chirurgicky odstranit. [Šístková, 2007; www.mou.cz] Maligní nádory naopak pronikají do jiných částí těla, než kde je lokalizován původní nádor – metastázuje. Metastázy, dceřiné nádory, se šíří lymfatickou nebo krevní cestou. [Hynie, 2003; www.mou.cz]

1.1.1 Léčba nádorových onemocnění

Při léčbě nádorových onemocnění musíme zničit buňky těla vlastní, nikoli buňky cizorodé, jako např. při bakteriálních infekcích, což léčbu výrazně komplikuje. Nádorové buňky se liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, a měly by být zničeny imunitním systémem. Tento rozdíl může být však velmi malý, a proto imunitní systém přítomnost nádorových buněk ignoruje nebo je nádorové buňky různými mechanismy paralyzují. [Stiborová, 2005]

K léčbě nádorových onemocnění se využívají cytostatika (protinádorová chemoterapeutika) spolu s ozářením a chirurgickým odstraněním nádoru. Cytostatika se začala využívat v 50. letech a největšího rozvoje dosáhla v 70. letech. [www.onkoforum.cz] Tyto látky inhibují mechanismy buněčné proliferace, a proto působí více na rychle rostoucí nádorové buňky. Ovlivňují však i buněčný růst nenádorových buněk (působí především na rychle rostoucí buňky - kostní dřeň, vlasové buňky aj.), velmi často mají také teratogenní účinky, a protože poškozují strukturu DNA, jsou též mutageny a karcinogeny. [Hynie, 2003]

Znalost mechanismu účinku protinádorového léčiva a jeho osud v organismu, může vést k navržení látek cíleně působících pouze na nádorové buňky. [Stiborová, 2005]

1.1.2 Faktory způsobující a ovlivňující nádorová onemocnění

Faktory mající vliv na vznik nádorového onemocnění můžeme rozdělit na **vnitřní** (dědičnost, oslabení a poškození obranyschopnosti organismu) a **vnější**.

Vnější faktory (**Obr. 2, str. 12**), které se mohou spolupodílet na vzniku až 90% nádorů [Stratil *et al.*, 2004], dělíme na: [Stiborová, 2002, 2005, 2010b; Stratil *et al.*, 2004]

- **Fyzikální:**

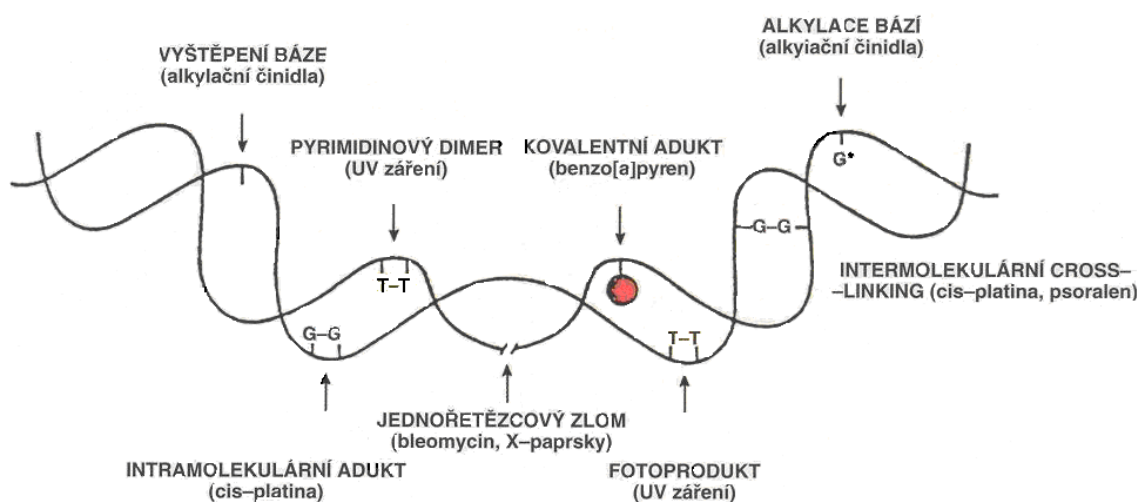
- vliv záření (ultrafialové, radioaktivní, Rentgenovo nebo kosmické záření),
- submikroskopické částice (azbest, sloučeniny berylia).

- **Biologické:** vliv infekce z některých virů (odhaduje se, že až 15 až 20% případů rakoviny je způsobeno onkoviry [Stiborová, 2005]), bakterií a parazitů.

- **Chemické:** vliv některých chemikálií, např. i nitroaromátů. (viz kap. 1.5.1)

Incidence nádorů narůstá s věkem, tedy s akumulací genových poruch v průběhu života. V ekonomicky vyspělých zemích má velký význam i skladba stravy, která obsahuje převahu cukrů a tuků a vede ke vzniku nadváhy či obezity, kouření, hormonální status, pracovní a životní prostředí, sexuální chování, konzumace alkoholu aj. [Stratil *et al.*, 2004]

Čím více je člověk vystavován působení různých karcinogenních činitelů, co do počtu a množství, tím dříve a více poruch DNA vzniká a tím je i větší riziko vzniku onkologického onemocnění. [Stratil *et al.*, 2004]



Obr. 2 Mechanismy poškození DNA různými vnějšími faktory. [Stiborová, Mikšanová., 1999]

Chemické karcinogeny můžeme podle mechanismu působení rozdělit na: [Stiborová, 2002, 2005]

- **genotoxické:** tvoří s DNA kovalentní adukty (např. 3-NBA).
- **způsobující změny ve struktuře DNA:** jedno- a dvou-řetězové zlomy DNA (single- a double-strand break DNA) nebo tzv. „cross-linking“ (propojování molekul)

způsobený bifunkčními činidly (intra- a inter-molekulární DNA-DNA „cross-linking“, DNA-protein „cross-linking“).

- **epigenetické**: tvoří nekovalentní interakce s DNA (např. interkalátory mající schopnost vmezeřit se do dvoušroubovice DNA).

1.2 *Karcinogeneze*

Karcinogeneze (někdy také kancerogeneze) je mnohostupňový proces, při němž dochází ke kumulaci poruch určitých genů, vedoucích k narušení funkce jimi kódovaných proteinů. Tyto proteiny se podílejí na regulaci dělení a diferenciaci buňky. Nejzávažnější jsou poruchy genů pro proteiny podílející se na přenosu signálů, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA a chromosomů, regulaci buněčného cyklu, dělení a diferenciaci buněk, mezibuněčné komunikace a přirozeného zániku (apoptózy) buněk. Pro karcinogenezi jsou významné poruchy jen poměrně malého počtu genů, jedná se o několik stovek genů, což představuje méně než 0,1% z celého genomu. [Stratil *et al.*, 2004]

Rozlišujeme dva typy genů, jejichž mutace může vést k vzniku nádorového bujení. Jsou to **protoonkogeny** a **tumor-supresorové geny**.

Produkty protoonkogenů se nazývají protoonkoproteiny a stimulují proliferaci buněk. Poškozením (mutací) vznikají onkogeny a onkoproteiny, jejichž nadměrná, nekontrolovatelná aktivita, působící na proliferaci buněk, může umožňovat proces karcinogeneze. [Stiborová, 2002, 2005]

Mez onkoproteiny patří: růstové faktory (Sis), receptory pro růstové faktory (Erb B), receptory pro hormony štítné žlázy, tyrosinkinasy (Abl, Src, Fes), proteinkinasy serinového a threoninového typu (Raf, Mos), G-proteiny (Ras) a transkripční faktory (Fos, Jun, Myc, Myb, Rel). [Stiborová, 2010b]

Produkty tumor-supresorových genů (*p21*, *p53* aj.) jsou inhibitory cyklin-dependentních-kinas (např. P21). Tyto proteiny tlumí proliferaci a indukují apoptózu buněk. Inhibitory cyklin-dependentních-kinas společně s cyklin-dependentními-kinasami a cykliny patří mezi regulátory buněčného cyklu. Porucha jejich funkce tedy vyvolá zvýšený růst buněk, který se může vyvinout až v nádorové onemocnění. [Hynie, 2003; Stiborová, 2002, 2010b]

1.1.3 Proces karcinogeneze

Proces chemické karcinogeneze se skládá nejméně ze tří fází: iniciační, promoční a progresní (**Obr. 3, str. 15**).

- INICIAČNÍ FÁZE

V iniciační fázi dochází ke změně genetické informace zdravé buňky, která vede k aktivaci onkogenů a k deaktivaci tumor-supresorových genů, tvoří se tzv. **iniciovaná buňka (prekarcinogenní léze)**. Tyto buňky se v organismu vytváří i spontánně, jejich poškozená DNA je však většinou opravena reparačními procesy nebo jsou zničeny imunitním systémem. [Stiborová *et al.* 1999; Stiborová, 2005]

Změna genetické informace spočívá převážně v různých modifikacích molekul DNA.

Nejvýznamnější modifikací DNA je vznik kovalentních aduktů, při kterém se vytváří kovalentní vazba karcinogenu na báze nebo deoxyribosu DNA. Většina karcinogenů vyžaduje pro schopnost vytvářet kovalentní adukty s DNA metabolickou aktivace. Z pro-karcinogenních forem jsou přeměňovány na formy reaktivní („ultimativní“), které jsou silnými elektrofilny schopnými vazby na DNA. Tímto způsobem iniciuje nádorové procesy více než 90% karcinogenů prokázaných jako karcinogeny pro člověka. [Stiborová *et al.* 1999; Stiborová, 2002]

Mezi další modifikace DNA patří také tvorba hydroxyderivátů bází DNA, které se vytváří působením radikálových forem kyslíku, tvorba cyklických aduktů tvořených z bifunkčních genotoxických činidel, poškození DNA vyvolané radiací, tvorba pyrimidinových dimerů, apurinace a apyrimidinace DNA a tvorba interkalátů. [Stiborová *et al.* 1999; Stiborová, 2005]

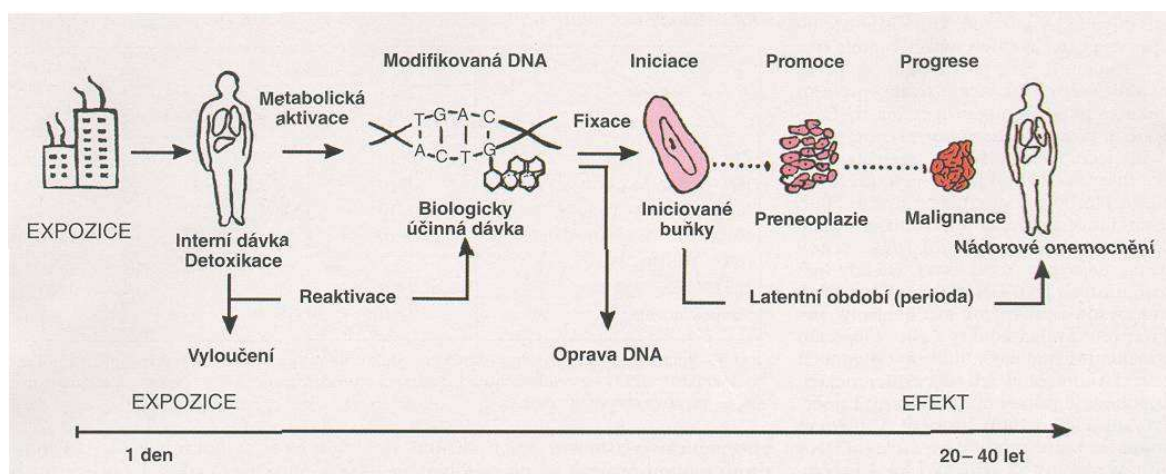
- PROMOČNÍ FÁZE

V promoční fázi dochází ke zvýšení proliferace iniciovaných buněk, což vede ke vzniku preneplasie neboli **benigního nádoru**. Promotory jsou látky, které většinou působí epigeneticky, tedy nepoškozují sekvenci DNA. Některé z nich jsou orgánově specifické (fenobarbital – játra, sacharin – močový měchýř, forbolester - kůže)

[Stiborová, 2010b], jiné působí současně v několika tkáních. Klíčovými faktory promoční fáze jsou hlavně aktivity proteinkinas a fosfatas a jejich regulace. Dalšími faktory jsou oxidativní změny molekul DNA způsobené aktivními formami kyslíku. [Stiborová *et al.* 1999; Stiborová, 2005]

- **PROGRESNÍ FÁZE**

Progresní fáze karcinogeneze je velmi podobná fázi iniciační. K modifikaci DNA však dochází ještě efektivněji. Výsledkem je vznik již totálně **maligně pozměněných buněk**, které se mohou šířit do dalších tkání. [Stiborová *et al.* 1999; Stiborová, 2005]



Obr. 3 Schéma procesu karcinogeneze. [Stiborová, Mikšanová., 1999]

1.3 Biotransformace xenobiotik

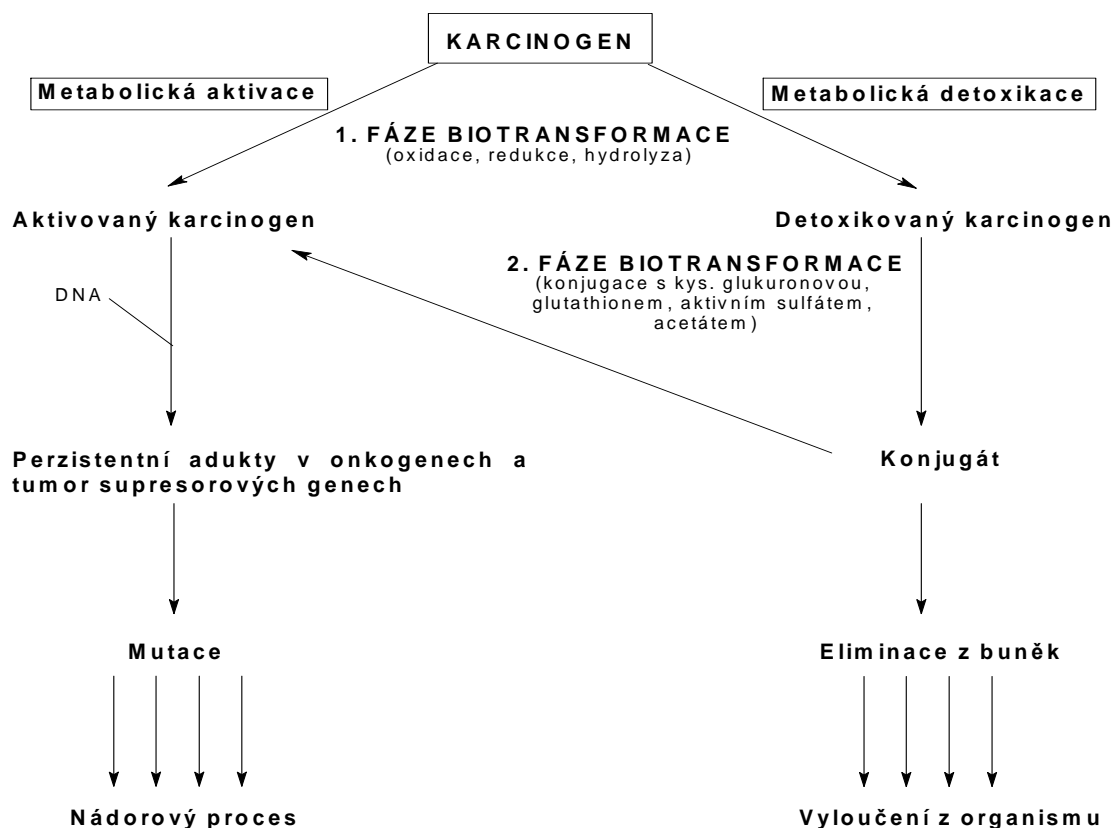
Cizorodé látky neboli xenobiotika (xenos – cizí, bios – život) jsou látky, které se v organismu běžně nevyskytují a často mají toxické účinky. Jde o sloučeniny přírodního původu nebo látky cíleně produkované převážně v chemickém průmyslu využívané např. v zemědělství (pesticidy, herbicidy), potravinářství (potravinářská aditiva – ochucovadla, barviva) spotřebním průmyslu (plasty, nátěrové hmoty) aj., mezi xenobiotika řadíme i léčiva. [Chromá *et al.*, 2001; Knejzlík *et al.*, 2000; Stiborová *et al.*, 2004a]

Po vstupu xenobiotik do organismu (ústí, inhalačně, pokožkou aj.) následuje transport krví k cílové tkáni. Způsob detoxikace a exkrece cizorodých látek z tkání závisí na jejich rozpustnosti ve vodě a tucích. Hydrofóbní látky velmi snadno prochází přes membrány a mají tendenci se akumulovat v organismu. Proto je k jejich vyloučení nutné zvýšení rozpustnosti ve vodě. **Biotransformací** označujeme enzymově katalyzované reakce vedoucí k přeměně xenobiotik na látky hydrofilní povahy, které se mohou snadno vyloučit z organismu. Naopak hydrofilní xenobiotika mohou být vyloučena přímo, v nezměněné formě. [Knejzlík *et al.*, 2000; Stiborová, 2005, 2010c; Stiborová *et al.*, 2004a]

Hlavním místem biotransformace jsou játra, i když biotransformační procesy probíhají také v plicích, ledvinách, kůži i GIT (tj. v místech jejich vstupu a exkrece). [Samcová, 2010]

Biotransformaci xenobiotik můžeme rozdělit na **detoxikační**, kdy dojde k eliminaci látky z buňky a následnému vyloučení z organismu a **aktivační**, kdy vzniká biologicky aktivnější sloučenina než parentální xenobiotikum (**Obr. 4, str. 17**). Tímto způsobem vznikají aktivní formy některých léčiv, ale také látky toxičtější, mutagenní a karcinogenní. [Chromá *et al.*, 2001; Knejzlík *et al.*, 2000; Lüllmann *et al.*, 2001; Stiborová, 2005, 2010c; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a] Až 98% genotoxických karcinogenů je aktivováno tímto způsobem. [Stiborová, 2005]

Poznání metabolismu xenobiotik u člověka by mohlo pomoci při zvyšování nebo modulování účinku léčiv nebo naopak ke snižování jejich vedlejších účinků. Dále by bylo možné omezovat rizika vznikající při působení potenciálně toxických a karcinogenních látek na lidskou populaci. [Stiborová *et al.*, 1999]



Obr. 4 Schéma metabolické aktivace a detoxikace karcinogenů. [Stiborová, 2002]

U eukaryotických organismů se rozlišují dvě hlavní fáze biotransformace xenobiotik.

1.3.1 I. fáze biotransformace xenobiotik

V I. fázi biotransformace, tzv. **derivatizační fázi**, dochází k zabudování funkčních skupin do molekuly xenobiotika nebo k odkrytí funkčních skupin, které jsou v molekule již přítomny. Tím se látka stává více polárnější.

Mezi reakce I. fáze biotransformace patří: [Chromá *et al.*, 2001; Knejzlík *et al.*, 2000; Martínková *et al.*, 2001]

Oxidace (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, tvorba epoxidů, dealkylace, sulfooxidace, deaminace aj.)

Redukce (aldehydů, ketonů, azosloučenin, nitrosloučenin)

Hydrolyza (amidů, esterů)

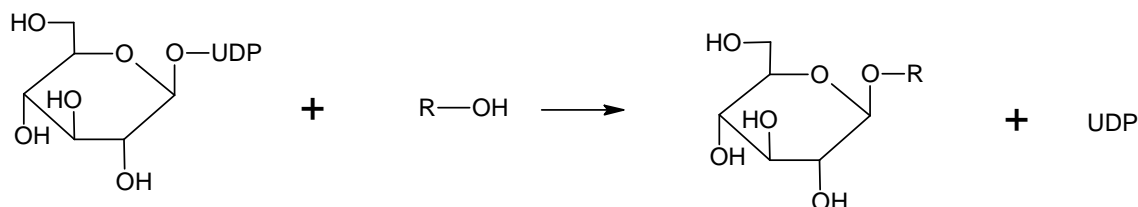
Hlavními derivatizačními enzymy jsou **monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí** (viz kapitola 1.4). [Chromá *et al.*, 2001; Knejzlík *et al.*, 2000; Martínková *et al.*, 2001; Stiborová, 2005; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

Mezi další enzymy I. fáze biotransformace patří: flavinové monooxygenasy (tzv. Zieglerův enzym), peroxidasy (např. prostaglandin H syntetasa (PHS), myeloperoxidasa), epoxid hydrolasa, NADPH:chinonoxidoreduktasa neboli DT-diaforasa (NQO1), xanthinoxidasa (XO), aldehydoxidasa, alkoholdehydrogenasa a aldehyddehydrogenasa. [Knejzlík *et al.*, 2000; Martínková *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

1.3.2 II. fáze biotransformace xenobiotik

II. fáze biotransformace, označovaná též jako **konjugační fáze**, zahrnuje děje vedoucí ke konjugaci derivatizovaných xenobiotik s endogenní látkou za vzniku konjugátu, který se tak stane ještě více rozpustným ve vodě. Poté dochází k exkreci, která probíhá nejčastěji močí nebo stolicí. [Chromá *et al.*, 2001; Knejzlík *et al.*, 2000; Lüllmann *et al.*, 2001; Martínková *et al.*, 2001; Stiborová, 2005; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

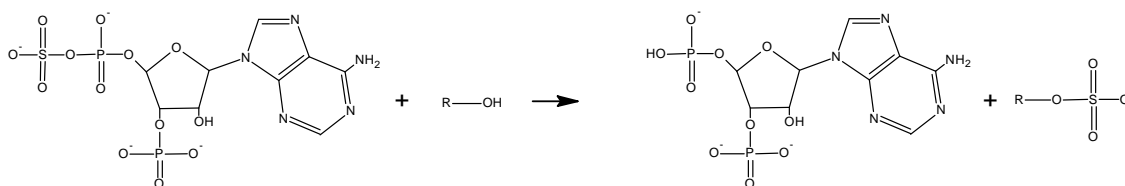
Velmi častou reakcí II. fáze biotransformace xenobiotik je konjugace s **glukuronovou kyselinou**, která do reakce vstupuje jako UDP-glukuronová kyselina za vzniku glukosiduronátu (**Obr. 5**). Při konjugačních reakcích s fenoly, alkoholy (**Obr. 5**) a s karboxylovými kyselinami vznikají O-glukosiduronáty (esterového, etherového typu). Dále se mohou vytvářet N-glukosiduronáty nebo S-glukosiduronáty. Tato reakce je katalyzována UDP-glukonosyltransferasou (UDP-GT). Největší koncentrace UDP-GT byly zaznamenány v játrech, v menší míře pak v ledvinách, plicích a střevní sliznici. [Knejzlík *et al.*, 2000; Řemínek, 2006]



Obr. 5 Konjugace derivatizovaného xenobiotika s uridyldifosfoglukuronovou kyselinou.

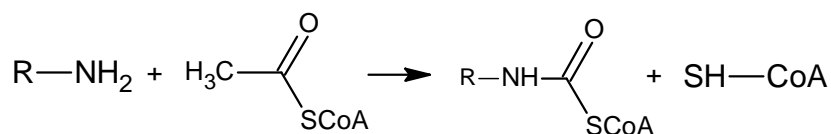
Analogicky, hlavně u rostlin, probíhá konjugace s **glukosou**, která se reakce účastní jako UDP-glukosa za vzniku β -glukosidu. [Knejzlík *et al.*, 2000; Stiborová, 2010c]

Dále může docházet k vazbě se **sulfátem**, který do konjugáčnických reakcí vstupuje v aktivní formě jako 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát (PAPS) (**Obr. 6**). Tato reakce je katalyzována sulfotransferasami (SULT). Sulfátová konjugace představuje nejdůležitější metabolickou dráhu fenolů. [Knejzlík *et al.*, 2000; Řemínek, 2006]



Obr. 6 Konjugace derivatizovaného xenobiotika s 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfátem.

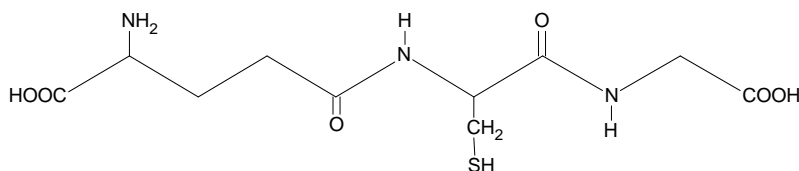
Dalším typem konjugáčnické reakce je vazba s **acetátem** (**Obr. 7**) katalyzovaná N,O-acetyltransferasami (NAT), které jako zdroj acetylu využívají acetylkoenzym A. Acetylace je důležitá při biotransformaci aromatických a heterocyklických aminů, hydrazinů a sulfoamidů. [Knejzlík *et al.*, 2000; Řemínek, 2006]



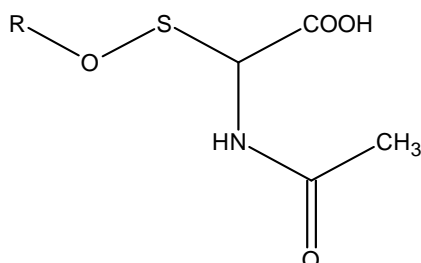
Obr. 7 Konjugace derivatizovaného xenobiotika s aktivním acetátem.

Konjugací s aktivním sulfátem nebo acetátem může docházet kromě detoxikační biotransformace také k aktivaci derivatizovaného xenobiotika, tedy ke vzniku více toxické látky. [Knejzlík *et al.*, 2000; Řemínek, 2006]

Derivatizované sloučeniny, např. epoxidy, mohou také interagovat s tripeptidem **glutathionem** (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin, GSH) (**Obr. 8A, str. 20**). Reakce může probíhat buď samovolně, nebo za katalýzy glutathion-S-transferas. Glutathionový konjugát může být buď přímo vyloučen, nebo je dalšími reakcemi (odštěpení glutamátu, glycinu a N-acetylací) přeměňován na kyselinu merkapturovou (např. N-acetyl-S-fenyl-cystein) (**Obr. 8B, str. 20**). [Knejzlík *et al.*, 2000; Řemínek, 2006; Stiborová, 2005, 2010c, is.muni.cz]



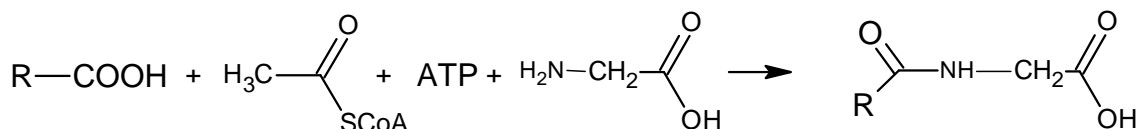
(A)



(B)

Obr. 8 A – Strukturní vzorec glutathionu, **B** – Strukturní vzorec kyseliny merkapturové.

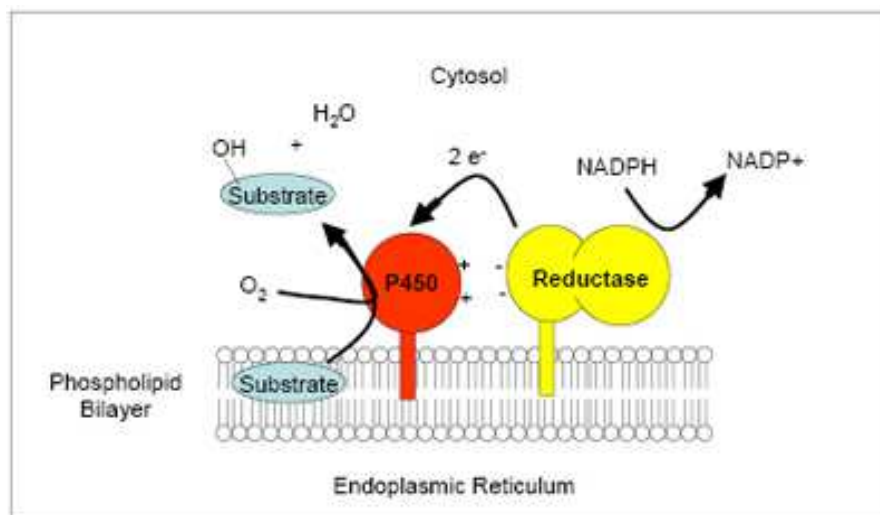
Dalším typem konjugací jsou reakce s **aminokyselinami**, hlavně s **glycinem** za vzniku hippurových kyselin (**Obr. 9**). Do těchto reakcí vstupují cyklické a aromatické kyseliny aktivované pomocí acyl-CoA synthetas na acyl-CoA. Další aminokyseliny využívané pro konjugační reakce jsou **alanin** nebo **taurin**. [Knejzlík *et al.*, 2000; Řemínek, 2006]



Obr. 9 Konjugace derivatizovaného xenobiotika s glycinem.

1.4 Mikrosomální monooxygenasový systém

Mikrosomální monooxygenasový systém, také nazývaný systém monooxygenas (oxidas) se smíšenou funkcí („Mixed Function Oxidases“ = MFO systém) (**Obr. 10, str. 21**), katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, peroxidačních popř. redukčních reakcí. [Chromá *et al.*, 2001; Stiborová, 2005; Stiborová *et al.*, 1999]



Obr. 10 Mikrosomální monooxygenasový systém [www.cchem.berkeley.edu]

MFO systém má tři základní složky:

- NADPH:cytochrom P450 reduktasu (viz kapitola 1.4.1)
- cytochrom P450 (viz kapitola 1.4.2)
- membránové lipidy

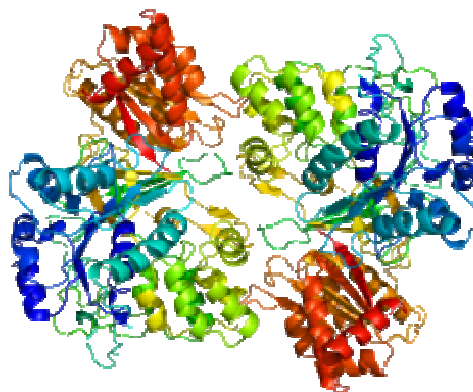
Membránové lipidy mají v MFO systému několik funkcí. Jednak způsobují konformační změny cytochromu P450, čímž dochází ke zvýšení afinity k substrátu, dále stimulují tvorbu komplexu cytochrom P450 - NADPH:cytochrom P450 reduktasa a jsou „zásobárnou“ uložených hydrofobních substrátů cytochromu P450. [Stiborová, 2005; www2.le.ac.uk]

Mezi fakultativní složky MFO systému patří:

- NADH:cytochrom b₅ reduktasa
- cytochrom b₅

1.4.1 NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa (NADPH:CYP reduktasa, POR, EC 1. 6. 2. 4) (**Obr. 11, str. 22**) je flavoproteinový enzym lokalizovaný na vnější straně membrány endoplasmatického retikula. Kromě NADPH obsahuje další dva typy kofaktorů - flavinadenindinukleotid (FAD) a flavinmononukleotid (FMN).[Vermilion *et al.*, 1981]



Obr. 11 Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy. [<http://en.wikipedia.org>]

NADPH:CYP reduktasa katalyzuje přenos elektronů z NADPH na různé cytochromy P450 na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin. [Oprian *et al.*, 1982; Vermilion *et al.*, 1981] Přenos elektronů byl popsán také na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin aj. [Stiborová *et al.*, 2004a]

NADPH:CYP reduktasa má dvě funkční domény. **N–terminální** hydrofobní doménou (6 kDa) je zakotvena v membráně. Tato doména zajišťuje vhodnou konformaci pro interakci s CYP. **C–terminální** hydrofilní doména (72 kDa) směřuje vně membránu endoplasmatického retikula, je funkční doménou a skládá se z FMN- a FAD- vazebných strukturních domén. [Wang *et al.*, 1997]

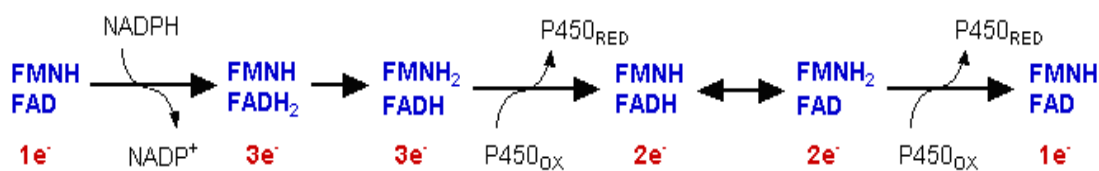
Mezi FMN- a FAD- vazebnými doménami je umístěna „spojovací“ struktura zodpovědná za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. [Wang *et al.*, 1997] FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8-methylových skupin isoalloxazinového kruhu, které leží těsně u sebe a svírají úhel asi 150°. Tímto způsobem je zajištěn nejspíše přímý (bez účasti aminokyselinových zbytků), a proto velmi rychlý přenos elektronů mezi flaviny. [Wang *et al.*, 1997]

FAD–vazebná doména je zodpovědná za navázání NADPH. Jedná se o nekovalentní spojení, ve kterém pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) interagují se záporně nabitou fosfátovou skupinou (vázanou v poloze 2' ribosy) NADPH. Přítomnost fosfátové skupiny v NADPH (oproti NADH) tedy zajišťuje vysokou selektivitu enzymu NADPH:CYP reduktasy vůči NADPH. [Wang *et al.*, 1997]

FMN–vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na akceptorovou molekulu (cytochrom P450, cytochrom c) a zprostředkovává tedy interakci mezi ní a NADPH:CYP reduktasou. [Stiborová *et al.*, 2004a; Vermilion *et al.*, 1981]

Interakce mezi NADPH:CYP reduktasou a cytochromem P450 jsou převážně elektrostatické – kladně nabitý povrch cytochromu P450 (lysin, arginin) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:CYP reduktasy (aspartát, glutamát). Dále se uplatňují i hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (leucin, tryptofan, valin) v oblasti membránových domén cytochromu P450 a NADPH:CYP reduktasy. [Wang *et al.*, 1997]

NADPH:CYP reduktasa slouží jako dělič elektronového páru (tzv. první a druhá redukce cytochromu P450 (**Obr. 14 str. 27**) [Stiborová *et al.*, 2004a]). Elektron je přenášen z NADPH přes FAD a FMN na cytochrom P450. [Oprian *et al.*, 1982; Vermilion *et al.*, 1981] Na počátku přenosu je flavinadenindinukleotid v oxidované formě - FAD a flavinmononukleotid ve formě radikálu – FMNH[•]. Nejdříve dojde k přenosu elektronů z NADPH na FAD za vzniku FADH₂ (redukováná forma). Následuje přenos elektronu z FADH₂ na FMNH[•] za vzniku FMNH₂ (redukováná forma) a dále pak na cytochrom P450, který je tak redukován (**Obr. 12**). [Stiborová *et al.*, 2004a; www.uky.edu]



Obr. 12 Přenos elektronu mezi prosthetickými skupinami FAD a FMN. [<http://www.uky.edu>]

Vedle endogenních substrátů (cytochromy P450, cytochrom c) NADPH:CYP reduktasa redukčně metabolizuje i nízkomolekulární cizorodé látky, např. 1,8–dinitropyren [Fu, 1990], 3–NBA [Arlt *et al.*, 2003], aristolochové kyseliny [Stiborová *et al.*, 2001], nebo dimethylaminoazobenzen a jeho metabolit methyldiminoazobenzen. [Fu, 1990]

NADPH:CYP reduktasa je enzym s velmi konzervovanou strukturou – homologie aminokyselinové sekvence je u různých mikrobiálních, rostlinných a živočišných druhů velmi podobná, což naznačuje důležitost tohoto enzymu během evoluce. [Wang *et al.*, 1997] Např. lidská a potkaní formy tohoto enzymu mají

homologii 92%, přičemž největší odlišnosti v aminokyselinové struktuře jsou v N-terminálních vazebných doménách, naopak FMN-strukturní domény jsou téměř identické. [Stiborová *et al.*, 2004a]

NADPH:CYP reduktasa je inducibilním enzymem. Úzce spolupracuje s cytochromy P450, a je i indukovaná stejnými látkami jako CYP, většinou však v menší míře. [Stiborová *et al.*, 2004a]

1.4.2 Cytochrom P450

Cytochrom P450 (CYP, EC 1.14.14.1.) je hemový enzym lokalizovaný v eukaryotických buňkách, hlavně v membráně hladkého endoplasmatického retikula, v menší míře pak v membráně mitochondrií. [Sabbioni *et al.*, 2006] V prokaryotických buňkách je tento enzym rozpustný. [Edwards *et al.*, 1991; Sabbioni *et al.*, 2006] V MFO systému má funkci terminální oxidasy. [Chromá *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

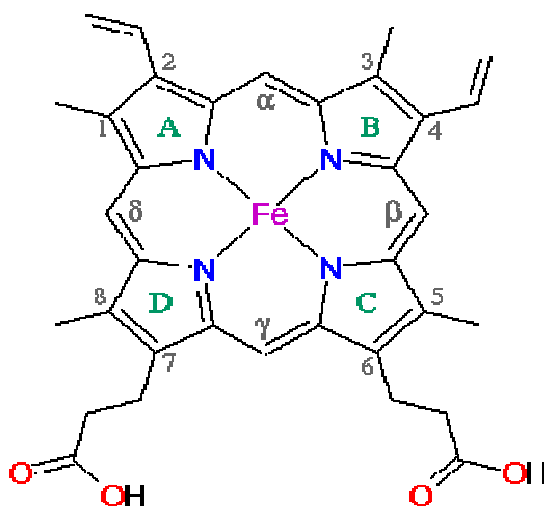
Označení P450 vyjadřuje, že se jedná o pigment, který po redukci hemového železa a navázání oxidu uhelnatého absorbuje při vlnové délce 450 nm. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Coon *et al.*, 1992]

Cytochromy P450 se vyvinuly přibližně před 3 miliardami let a pravděpodobně se účastnily metabolismu steroidních látek (např. cholesterolu) důležitých pro zachování membránové integrity. Schopnost přeměňovat cizorodé látky se objevila teprve v posledních 100 až 500 milionech let pravděpodobně v důsledku koexistence rostlin a živočichů. Rostliny si musely vytvořit mechanismy (produkce fytotoxinů, fytoalexinů), které je chránily před živočichy vyhledávajícími rostlinou potravu. Proto u živočichů došlo ke zmnožení jejich cytochromů P450, které se adaptovaly pro účely detoxikace a urychlení eliminace ochranných látek rostlin. V důsledku toho se u některých druhů vytvořily nové geny cytochromů P450 a naopak některé druhy určité geny ztratily. [Gonzales, Gelboin, 1992; Stiborová *et al.*, 1999]

1.4.2.1 Struktura cytochromu P450

Cytochrom P450 obsahuje jednu molekulu hemu b (**Obr. 13, str. 25**). Porfyrinový skelet (protoporfyrin IX) je v molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné

v aktivním centru enzymu, která je pátým ligandem železa v hemu. (Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody). Nejedná se tedy o klasický cytochrom, u něhož je protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu (hemoglobin, myoglobin) [Voet *et al.*, 1995], ale o **hemthiolátový protein**. Tento typ vazby umožňuje aktivaci molekuly kyslíku – oxidasová aktivita, což je unikátní vlastnost všech cytochromů P450. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Chromá *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]



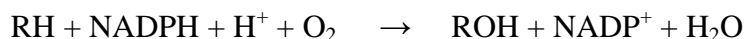
Obr. 13 Struktura hemu b [http://metallo.scripps.edu]

Stejný typ vazby obsahují i enzymy NO synthesis, která se svojí strukturou částečně podobá cytochromům P450 [White *et al.*, 1992], a chloroperoxidasa. Přesto se neřadí do rodiny cytochromů P450. [Anzenbacher *et al.*, 2001]

1.4.2.2 Monooxygenásová reakce cytochromu P450

Cytochrom P450 je schopen aktivovat molekulu kyslíku (tzv. oxidasová aktivita), a zabudovat jeden atom kyslíku do molekuly substrátu (tzv. oxygenasová aktivita). Druhý atom kyslíku je redukován na molekulu vody. (Vedle kyslíku mohou být pro oxidační reakce využity také peroxidy nebo peroxykyseliny). Elektrony potřebné k této redukci dodává NADPH prostřednictvím NADPH:cytochrom P450 reduktasy (viz kap. 1.4.1), někdy také NADH prostřednictvím NADH:cytochrom b_5 reduktasy. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Coon *et al.*, 1992; Chromá *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

Obecně tuto reakci popisuje následující rovnice:



Jednotlivé kroky procesu katalyzovaného MFO systémem jsou znázorněny na **Obr. 14, str. 27**. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Coon *et al.*, 1992; Chromá *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2004a]

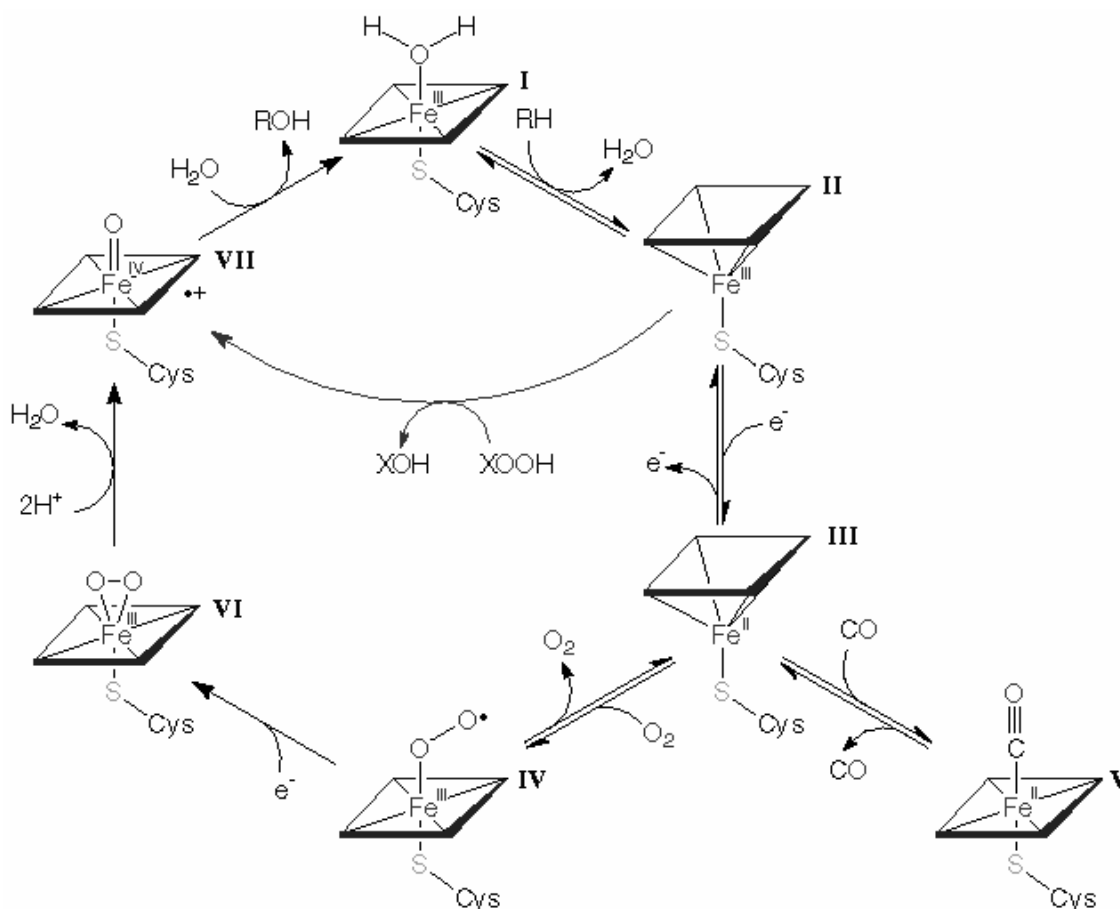
- V klidovém stavu je hemové železo cytochromu P450 ve ferri formě (má oxidační číslo III) a je hexakoordinované (nizkospinový stav).
- V prvním kroku cytochrom P450 naváže substrát, čímž vzniká binární komplex enzym–substrát. Zároveň tím dojde ke změně konformace hemového železa z hexakoordinované na pentakoordinovanou (vysokospinový stav) a také ke konformační změně enzymu, která se projeví jinými spektrálními vlastnostmi cytochromu P450.
- V druhém kroku dojde k redukci hemového železa: $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ - ferro forma (má oxidační číslo II). Elektron pro tuto redukci dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa z NADPH. (Hemové železo v oxidovaném stavu není schopné vázat molekulární kyslík ani jiný ligand).
- Ve třetím kroku redukovaný hem váže molekulu kyslíku a vzniká ternární ferri-superoxidový komplex. Hemové železo je opět hexakoordinované (nizkospinový stav). (Mohou se vázat i jiné ligandy např. oxid uhelnatý).
- Ve čtvrtém kroku dojde k redukci ternárního komplexu elektronem dodaným opět NADPH:cytochrom P450 reduktasou z NADPH nebo enzymem NADH:cytochrom b₅ reduktasou z NADH, za vzniku peroxidového aniontu. Tímto krokem dojde k úplné aktivaci molekuly kyslíku.

Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex se rozpadá a z uvolněného superoxidaniontového radikálu vzniká peroxid vodíku.

- V pátém kroku se rozštěpí vazba v molekule kyslíku. Jeden atom kyslíku je protonizován a uvolňuje se ve formě vody. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na hemové železo ve formě kyslíkového radikálu, který je schopný

odštěpit atom vodíku z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylového radikálu navázaného na hemové železo.

- V šestém kroku dojde k rekombinaci obou radikálů a k odštěpení hydroxylované molekuly substrátu. Cytochrom P450 se dostane do výchozího stavu.
- V přítomnosti oxidačních činidel, jako jsou organické peroxidy (XOOH), může z komplexu II vznikat přímo komplex VII (Obr. 14). Tato reakce se označuje jako **peroxidásová aktivita cytochromu P450**. Účinnost oxidace substrátů peroxidasovou aktivitou cytochromu P450 je většinou nižší než reakce za přítomnosti NADPH a O_2 , protože může docházet k destrukci enzymu. Další rozdíl je v mechanismu obou reakcí. Reakce s organickými peroxidy probíhají neuspořádaným mechanismem (oproti reakcím probíhajícím za přítomnosti NADPH a O_2), takže vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu. [Chromá *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 2004a]

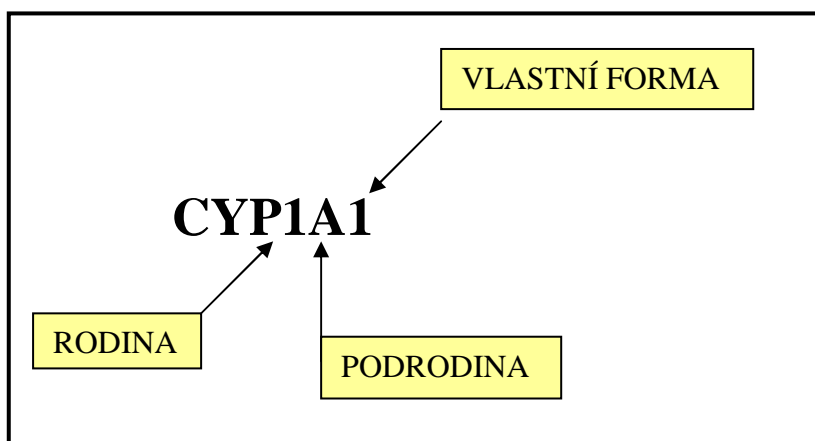


Obr. 14 Mechanismus monooxygenasové reakce cytochromu P450. [<http://metallo.scripps.edu>]

1.4.2.3 Nomenklatura cytochromu P450

Existuje velké množství různých forem (izoforem, izoenzymů) cytochromů P450. Tyto formy třídíme podle homologie jejich primární struktury proteinových molekul do rodin (homologie větší než 40%) a podrodin (homologie větší než 60%). [Anzenbacher *et al.*, 2001; Badyal *et al.*, 2001; Coon *et al.*, 1992; Gonzales, Gelboin, 1992; Chromá *et al.*, 2001; Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

Pro cytochromy P450 se podle Neberta a spolupracovníků používá zkratka CYP (CYtochrome P450), za ní následuje číslo označující rodinu, dále písmeno označující podrodinu a další číslo označující konkrétní izoenzym (**Obr. 15**). Geny cytochromů P450 se označují stejně jako enzymy, ale píší se kurzívou, např. *CYP1A1*. [Nebert *et al.*, 1989]



Obr. 15 Nomenklatura cytochromů P450.

1.4.2.4 Formy cytochromů P450

Člověk má ve svém genomu 59 různých forem cytochromů P450 [Ingelman-Sundberg, 2004], které rozdělujeme do 17 rodin. Rodiny CYP1, CYP2 a CYP3 se účastní metabolismu xenobiotik, a to až ze 70 – 80% [Edwards *et al.*, 1991; Ingelman-Sundberg, 2004] (částečně i rodina CYP4). Ostatní rodiny participují na metabolismu endogenních látek - biosynthesa steroidů, cholesterolu, žlučových kyselin, prostaglandinů, tromboxanů, metabolismus mastných kyselin, kyseliny arachidonové, retinové aj. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 1992, 2006; Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová *et al.*, 1999]

S rostoucím množstvím rozřešených krystalových struktur cytochromů P450 bylo zjištěno, že i když je sekvenční identita pouze 10 – 30%, mají jednotlivé cytochromy P450 velmi podobnou terciární strukturu. [Mestres, 2005] Velmi konzervovanou oblastí je cystein tvořící thiolátovou vazbu s hemem. [Gonzales, Gelboin, 1992; Mestres, 2005; Stiborová *et al.*, 1999] Naopak místa podílející se na vazbě substrátu vykazují poměrně vysokou strukturní variabilitu. [Mestres, 2005]

Cytochromy P450 se vyskytují ve všech tkáních (kromě svalů a erytrocytů [is.muni.cz]), nejvíce jsou však zastoupeny v játrech, kde probíhá největší počet biotransformačních reakcí. Významné je i jejich zastoupení v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku a nadledvinkách. [Kousalová *et al.*, 2003, Stiborová *et al.*, 1999]

V procesu metabolismus cizorodých látek v lidském organismu jsou nejvýznamnější následující jaterní cytochromy P450 1A2, 2A6, 2D6, 2C (8, 9, 18, 19), 2E1 a 3A4. [Stiborová *et al.*, 1999]

Z cytochromů P450 vyskytujících se ve vyšších koncentracích v jiných lidských tkáních (plíce, ledviny, GIT, kůže aj.) se na biotransformačních reakcích xenobiotik nejvíce podílí cytochromy P450 1A1, 2B6, 2E1 a 3A4. [Stiborová *et al.*, 1999]

Procentuální zastoupení jednotlivých cytochromů P450 je uvedeno v následující tabulce (**Tabulka 1, str. 30**) [Anzenbacher *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 1999; Stratil *et al.*, 2004]

Tabulka 1 Zastoupení jednotlivých cytochromů P450 podílejících se na metabolismu cizorodých látek v lidském organismu. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Stiborová *et al.*, 1999; Stratil *et al.*, 2004a]

Cytochrom P450	Zastoupení jednotlivých cytochromů P 450 %
1A1	0,1 - 1
1A2	13
1B1	1
2A6	4
2B6	0,2
2C	18
2D6	2,5
2E1	7
3A4	28

Tyto hodnoty jsou pouze orientační. Množství jednotlivých cytochromů P450 je ovlivňováno několika faktory – vnější podmínky (enviromentální polutanty), výživa, věk [Sotaniemi *et al.*, 1997], kouření, konzumace alkoholu, užívání léků aj. Mezi tyto faktory patří také genetický polymorfismus a vliv induktorů a inhibitorů. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Badyal *et al.*, 2001; Goshman *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 1999]

1.4.2.5 Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus (geneticky podmíněná odlišnost vyskytující se alespoň u 2% uvažované populace [Guengerich, 2005]) cytochromů P450 je faktor způsobující např. absenci cytochromu P450 v důsledku vrozené změny DNA, nemožnosti indukce cytochromů P450, tvorby cytochromu P450 s pozměněnou katalytickou aktivitou nebo vzniku cytochromu P450 se zvýšenou nebo sníženou katalytickou aktivitou. Značný genetický polymorfismus se vyskytuje převážně u CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 1992, 2006; Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová *et al.*, 1999]

1.4.2.6 Regulace hladiny cytochromů P450 indukci enzymu

Protože je většina cytochromů P450 inducibilní, jejich množství může být ovlivněno i přítomností různých induktorů (**Tabulka 2, str. 33**). Indukci můžeme rozdělit na přímou a nepřímou.

Přímou indukci se myslí stimulace transkripce genů. Obecný mechanismus spočívá v navázání ligandu na receptor a následném spuštění kaskády dějů vedoucí k transkripci příslušného genu. [Botts *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2006; Honkakoski *et al.*, 2000; Ingelman-Sundberg, 2004]

Pro cytochromy P450 biotransformující cizorodé látky jsou významné tyto receptory. [Botts *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2006; Honkakoski *et al.*, 2000; Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová, 2010c; Axman, 1999]

- **AhR** (aryl hydrocarbon receptor)

AhR je cytosolární receptor participující na indukci genů *CYP1A1*, *CYP1A2* a *CYP1B1*. Mezi xenobiotika interagující s AhR patří polycyklické aromatické uhlovodíky, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), β -naftoflavon (β -NF), Sudan I, benzo[a]pyren, omeprazol, aj.

- **PXR** (pregnane X receptor)

PXR je jaderný receptor indukující geny *CYP3A4* a *CYP2C9*. Mezi xenobiotika aktivující tento receptor patří např. pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN), rifampicinem a dexamethasonem.

- **CAR** (constitutively active receptor)

CAR je také jaderný receptor účastnící se indukce genů *CYP2B6*, *CYP3A4* a *CYP2C9*. Příkladem cizorodé látky interagující s CAR je fenobarbital (PB).

- **PPAR** (peroxisome proliferator-activated receptor)

PPAR je další jaderný receptor indukující geny *CYP4A*. Je aktivován např. fibráty.

Nepřímá indukce spočívá ve stabilizaci již vzniklé messenger RNA (mRNA) nebo zásahu do translačních a post-translačních procesů. [Ingelman-Sundberg, 2004] Příkladem nepřímé indukce je stabilizace mRNA a také samotného enzymu CYP2E1 ethanolem, acetonem nebo imidazolem. [Coon *et al.*, 1992; Stiborová, 2010c]

1.4.2.7 Substrátová specifita

Velmi důležitou vlastností pro cytochromy P450 je jejich substrátová specifita. Obecně lze říci, že cytochromy P450 mají širokou substrátovou specifitu a dále, že cytochromy P450 podílející se na metabolismu endogenních látek mají vyhraněnější substrátovou specifitu než enzymy biotransformující cizorodé látky. [Guengerich, 1992; Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová *et al.*, 1999, 2004a]

Důležité cytochromy P450 podílející se na přeměnách prokarcinogenů na jejich aktivní formy (vázající se na endogenní látky jako jsou nukleové kyseliny a proteiny) nebo poškozující buňky tvorbou radikálů (aktivních forem kyslíku) jsou např. P450 1A1, 1A2 a 2E1 (**Tabulka 2, str. 33**). [Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová *et al.*, 1999]

Tabulka 2 Variabilita obsahu cytochromů P450 u člověka, příklady jejich substrátů a induktorů. [Anzenbacher *et al.*, 2001; Guengerich, 1992; Goshman *et al.*, 2003; Ingelman-Sundberg, 2004; Stiborová *et al.*, 1999; Stiborová, 2010c]

Cytochrom P450	Rozsah variability obsahu cytochromu P450	Substrát	Induktor
1A1	100 krát	polycyklické aromatické uhlovodíky např. benzo[<i>a</i>]pyren, tabákově specifický nitrosamin,dioxiny, tamoxifen, aflatoxin	benzo[<i>a</i>]pyren, 5,6-benzoflavon, 3-methylcholanthren, 2-acetylaminofluoren, omeprazol, kouření
1A2	40 krát	pyrolytické produkty potravin – heterocyklické a aromatické aminy, 4-aminobifenyl, 2-naftylamin, 2-aminofluoren, 2-aminoanthracen, N-nitrosonikotin,	heterocyklické aminy, polychlorované bifenyly, benzo[<i>a</i>]pyren, 5,6-benzoflavon, β-naftoflavon, omeprazol, kouření, jídlo připravované na dřevěném uhlí
2A6	30 – 100 krát	N-nitrosodiethylamin, butadien, 6-aminochrysen, kumarin, aflatoxin	(konstitutivní enzym)
2B6	50 krát	6-aminochrysen, dibenzo[<i>a,h</i>]anthracen, nikotin, aflatoxin	barbituráty,dexamethason
2C	25 – 100 krát		barbituráty, rifampicin, ethanol
2D6	Více než 100 krát	aminy	barbituráty, ethanol
2E1	20 krát	benzen, styren, vinylchlorid, vinylbromid, akrylonitril, vinylkarbamát, ethylkarbamát, trichlorethylen, N-nitrosodiethylamin, chloroform	ethanol, aceton, toluen, isoniazid, cukrovka, hladovění
3A4	30 krát	benzo[<i>a</i>]pyren, 6-aminochrysen, 1-nitropyren, tris(2,3-dibromopropyl)fosfát, tamoxifen, aflatoxin	barbituráty, dexamethason, rifampicin, erythromycin, klofibrát

1.5 Aromatické nitrosloučeniny

Aromatické nitrosloučeniny, které se nacházejí ve složkách životního prostředí, vznikají z oxidů dusíku produkovaných všemi vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, tepelná likvidace odpadů, zpracování kovů aj.) a z polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), které patří mezi vzdušné polutanty produkované spalovacími procesy především automobilové dopravy. Lokální znečištění aromatickými nitrosloučeninami je vyvoláno zejména úniky z technologií jejich vývoje a zpracování. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Čechová, 2010; Nagy *et al.*, 2005, 2007; Stiborová, 2002; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006; Takamura-Enya *et al.*, 2006; Bieler *et al.*, 2007; Reynisson *et al.*, 2008]

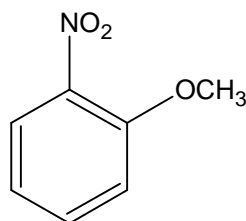
Mezi aromatické nitrosloučeniny patří celá řada látek, které se liší různým působením na organismus. Tato speciální působení vyplývají z různorodosti jejich metabolických cest a enzymů, které se jich účastní. Většina nitroaromátů vykazuje v bakteriálních a savčích systémech mutagenní aktivitu a jsou též karcinogeny vyvolávajícími nádorové procesy, především v játrech, plicích a prsních žlázách. Některé z aromatických nitrosloučenin se používají jako léčiva (nitrofurany, nitroimidazoly). [Stiborová, 2002]

1.5.1 Významné nitroaromáty

Národní toxikologický program USA označil jako silně podezřelé karcinogeny pro lidský organismus tyto nitrosloučeniny: 2-nitroanisol, 1-nitropyren, 4-nitropyren, 1,6-dinitropyren, 1,8-dinitropyren, 6-nitrochrysen a nitrofen. [National Toxicology Program, 1998] Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) uvádí ještě 2-nitrofluoren. [IARC, 1989] Mezi další fyziologicky účinné nitroaromáty patří nitrofurany a nitroimidazoly používané jako léčiva v humánní a veterinární medicíně a též rostlinné produkty aristolochové kyseliny. [Stiborová, 2002]

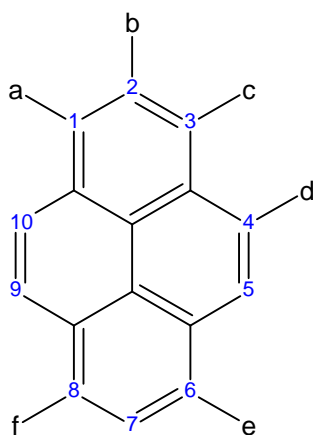
2-Nitroanisol (1-methoxy-2-nitrobenzen) (**Obr. 16, str. 35**) se hlaně využívá jako prekurzor při výrobě o-anisidinu (2-methoxyanilinu) pro výrobu různých azobarviv. Dále pak ve farmaceutickém průmyslu jako meziprodukt při syntéze některých léčiv. Je toxickou sloučeninou vyvolávající anemii a methemoglobinemii,

což má za následek poruchy dýchání a urychlenou destrukci erytrocytů. Je rovněž karcinogenem. [Stiborová, 2002]

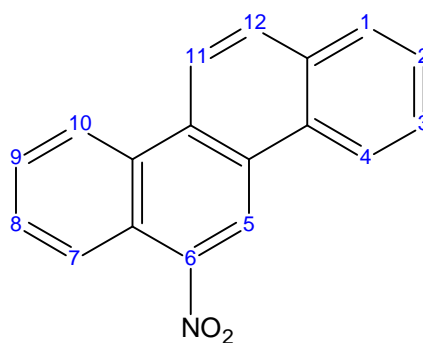


Obr. 16 Strukturní vzorec 2-nitroanisolu

Nitropyreny (Obr. 17) patří mezi vzdušné polutanty, vyskytující se ve výfukových plynech, 1-nitropyren je hlavní složkou a dinitropyreny (substituovány v polohách 1,3, 1,6 a 1,8) jsou minoritními složkami. [IARC, 1989] Všechny mono- a dinitropyreny jsou pro experimentální zvířata karcinogenní. Z těchto sloučenin jsou nejnebezpečnější 1-nitropyren a 6-nitrochrysen, které jsou spojovány s vývojem nádorových onemocnění (1-nitropyren - plicní nádory [Tokia *et al.*, 1993], 6-nitrochrysen - nádory plic [el-Bayoumy *et al.*, 1989], jater [el-Bayoumy *et al.*, 1989] a prsních žláz). [Stiborová, 2002]



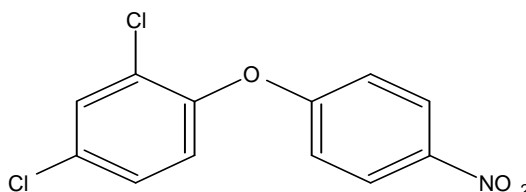
(A)



(B)

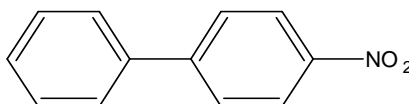
Obr. 17 Strukturní vzorce nitropyrenů (A) (a je NO₂ a b-f jsou vodíky (H) pro 1-nitropyren; b je NO₂ a a a c-f jsou H pro 2-nitropyren; d je NO₂ a a-c, e a f jsou H pro 4-nitropyren; a a c jsou NO₂, a b a d-f jsou H pro 1,3-dinitropyren; a a e jsou NO₂ a b-d a f jsou H pro 1,6-dinitropyren; a a f jsou NO₂ a b-e jsou H pro 1,8-dinitropyren) a **6-nitrochrysen (B)**.

Nitrofen [(2,4-dichlorfenyl)(4-nitrofenyl)ether] (**Obr. 18**) se dlouhou dobu používal jako kontaktní herbicid v ochraně kulturních plodin (rýže, květák, brokolice, zelí, cibule, česnek a celer). Jeho používání bylo však zakázáno kvůli silným karcinogenním účinkům na experimentální zvířata. [Stiborová, 2002]



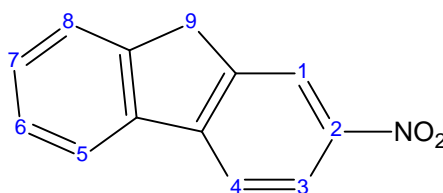
Obr. 18 Strukturální vzorec nitrofenu

4-Nitrobifenyl (**Obr. 19**) a jeho redukční derivát **4-aminobifenyl** jsou polutanty pracovního prostředí chemického průmyslu, které vyvolávají nádory močového měchýře. [Deichman *et al.*, 1958; Shirai *et al.*, 1981]



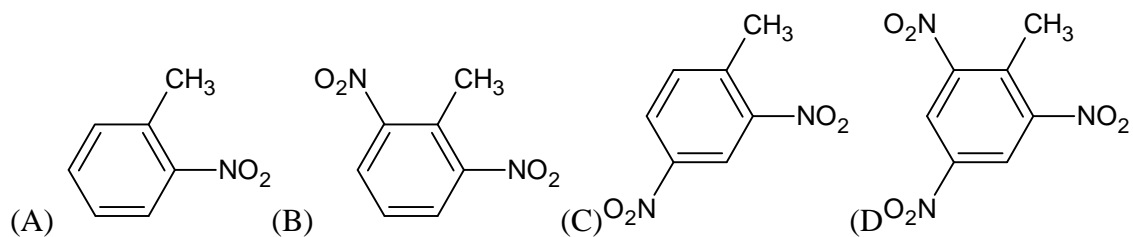
Obr. 19 Strukturální vzorec 4-nitrobifenylu

Další silně karcinogenní nitroaromáty vykazující mutagenní a karcinogenní účinky u hlodavců jsou **2-nitrofluoren** (**Obr. 20**), **dinitrofluoreny** (substituovány v polohách 2,5 a 2,7) a **9-oxoderiváty nitrofluorenů**. [Kitchin *et al.*, 1988]



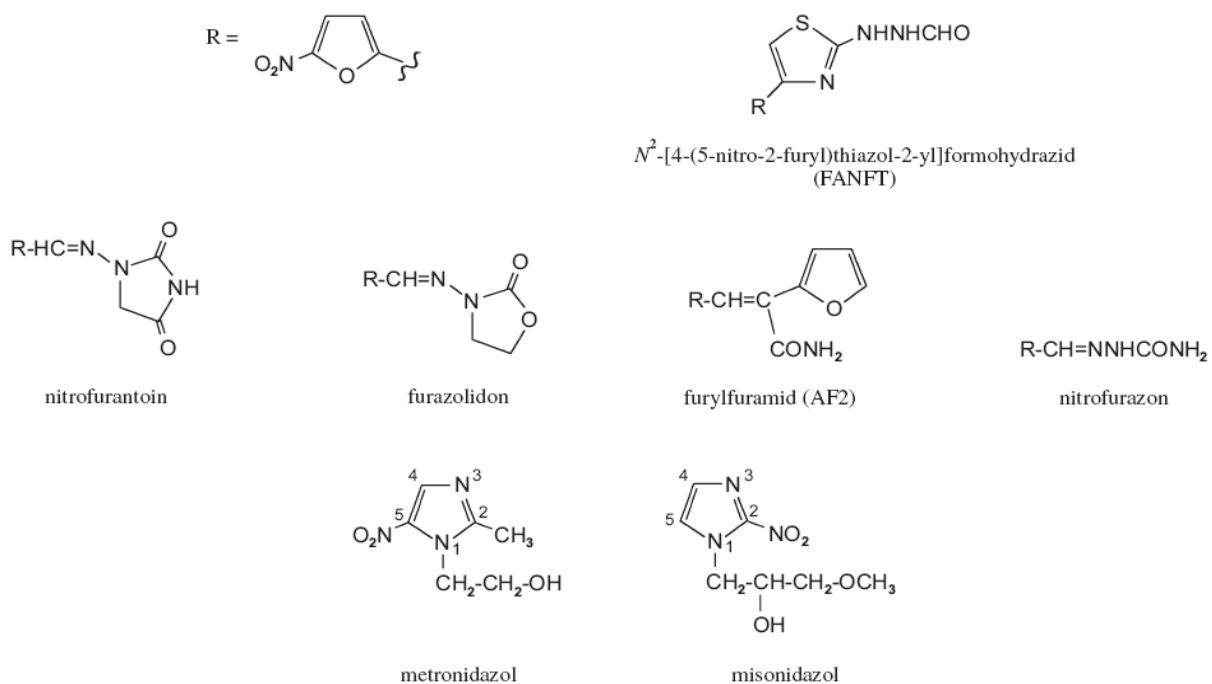
Obr. 20 Strukturální vzorec 2-nitrofluorenu

Mezi nitroaromáty patří také mono-, di- a trinitrotolueny. Z nich **2-nitrotoluen**, **2,4-dinitrotoluen**, **2,6-dinitrotoluen** a **2,4,6-trinitrotoluen** (**Obr. 21**, str. 37) patří mezi karcinogenní látky vyvolávající abnormality ve struktuře erytrocytů a rakovinu močových cest. [Sabbioni *et al.*, 2006]



Obr. 21 Strukturní vzorce 2-nitrotoluenu (A), 2,6-dinitrotoluenu (B), 2,4-dinitrotoluenu (C) a 2,4,6-trinitrotoluenu (D).

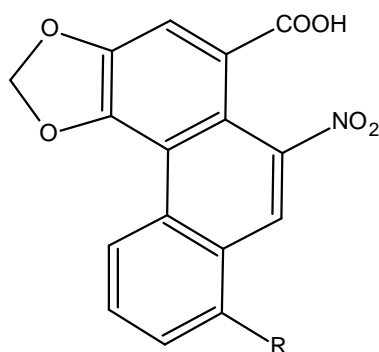
Nitrofurany a nitroimidazoly (Obr. 22) jsou používané jako léčiva v humánní a veterinární medicíně vzhledem k jejich antibakteriálním účinkům. [Cohen *et al.*, 1978] Nitroimidazoly vykazují v bakteriálních testech mutagenní aktivitu, u savců je však tato aktivita mnohem menší. 5-Nitroimidazoly (např. metronidazol) jsou účinné proti *Trichomonas vaginalis* a některým infekčním onemocněním. [Wiessler, 1994] Misonidazol (2-nitroimidazol) zvyšuje účinek v radiční terapii. [Wiessler, 1994] Nitrofurantoin se využívá k léčbě močových a pohlavních infekcí. [Race *et al.*, 2005] Nitrofurazon zase našel uplatnění při léčbě popálenin nebo u pacientů s transplantací kůže. [Race *et al.*, 2005]



Obr. 22 Struktura nitrofurenů a nitroimidazolů. [převzato z Stiborová, 2002]

Aristolochové kyseliny (Obr. 23, str. 38) jsou přírodní látky, které také patří mezi nebezpečné nitroaromáty. Vyskytují se ve všech částech (především v kořenech

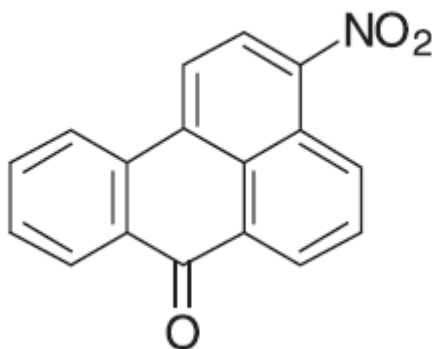
a listech) rostlin čeledi *Aristolochiaceae* (podražcovité). V lidovém léčitelství se používaly již od nepaměti. [Stiborová *et al.*, 2000, 2005b] Jejich použití v léčbě nadváhy pomocí čínských bylin však bylo fatální. [Stiborová *et al.*, 2000, 2005b] Způsobují především ledvinná selhání a vznik nádorů močových cest. Jejich farmaceutické používání proto bylo zakázáno. [Stiborová, 2002]



Obr. 23 Aristolochové kyseliny I: R = OCH₃, Aristolochové kyseliny II: R = H.

1.6 3 – Nitrobenzanthron

3-Nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) (**Obr. 24**) je jednou z polycyklických aromatických nitrosloučenin s vysokými toxickými účinky.



Obr. 24 Strukturní zorec 3-nitrobenzanthronu

Patří mezi nejsilnější mutageny, je karcinogenem pro hlodavce [Nagy *et al.*, 2005] a také potenciálním karcinogenem pro člověka. [Arlt, 2005] Genotoxicita 3-NBA byla prokázána jeho schopností vytvářet specifické adukty s DNA. Výskyt těchto aduktů byl pozorován *in vitro*, v buněčných kulturách a *in vivo* v organismu

laboratorního potkana a myši. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Čechová, 2010; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]

Teprve nedávno se prokázalo, že se 3-NBA vyskytuje ve složkách životního prostředí a je přítomný i ve výfukových plynech. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Čechová, 2010; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008] Proto jeho genotoxické účinky mohou reprezentovat vysoké riziko především pro pracovníky benzínových stanic, profesionální řidiče či mechaniky autoopraven [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002]. Jeho koncentrace v ovzduší je srovnatelná s koncentracemi běžných polutantů jako jsou 1-nitropyren, 1,3-, 1,6-, a 1,8-dinitropyreny nebo benzo[a]pyren a pohybuje se v rozmezí od 0,6 do 6,6 p.p.m.. Z toho lze vyvodit, že člověk za den přijme dýcháním asi 90 pg této látky. [Nagy *et al.*, 2007] Byl také detekován v půdě a jeho výskyt byl prokázán i v dešťové vodě. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2004, 2005, 2007; Čechová, 2010; Stiborová *et al.*, 2005a]

3-NBA je tvořen pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty nebo reakcí parentálního polycyklického uhlovodíku s oxidy dusíku v atmosféře. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2007, 2008; Čechová, 2010; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006; Bieler *et al.*, 2007] Protože 3-NBA vstupuje do organismu převážně inhalační cestou, jsou plíce hlavním rizikovým orgánem pro jeho toxické účinky. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2005; Čechová, 2010; Stiborová *et al.*, 2005a, 2008; Bieler *et al.*, 2007]

Redukčním metabolitem 3-NBA je 3-aminobenzanthron (3-ABA). Přítomnost této látky byla nedávno prokázána v moči pracovníků solných dolů, kteří byli vystaveni působení výfukových plynů. Proto by tato sloučenina mohla sloužit jako „marker“ výskytu 3-NBA. Také pro tuto sloučeninu byly prokázány její genotoxické vlastnosti, a to detekcí tvorby specifických aduktů s DNA. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Čechová, 2010; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Nagy *et al.*, 2007; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]

1.6.1 Metabolismus 3-NBA

Předpokládaná metabolická aktivace 3-NBA a jeho derivátu 3-ABA vedoucí ke vzniku aduktů s DNA je uvedena na **Obr. 25 (str. 41)**. Biotransformace 3-NBA

probíhá hlavně redukční cestou, která je v organismech závislá na enzymové katalýze. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2008; Čechová, 2010; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008]

V první fázi biotransformace 3-NBA se nejdříve redukuje nitro-skupina ($-\text{NO}_2$) přes nitrosoderivát na N-hydroxylamin ($-\text{NHOH}$), dochází tedy k přeměně 3-NBA na N-hydroxy-3-aminobenzanthron (N-OH-ABA). Tato reakce je v lidských a potkaních játrech katalyzována cytosolárním enzymem NAD(P)H:chinon oxidoreduktasou (NQO1, DT – diaforasou) a v menší míře též xanthinoxidasou (XO) či mikrosomálním enzymem NADPH:cytochrom P450 reduktasou (POR). Dále bylo zjištěno, že NQO1 je mnohem účinnější než POR. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007]

Vzniklý N-hydroxylamin je pravděpodobně kritickým intermediátem pro tvorbu aduktů s DNA. Je nestabilní, přeměňuje se na nitréniový ion, a ten buď sám, nebo po přeměně na karbéniový ion reaguje s DNA a vytváří specifické adukty s DNA. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007]

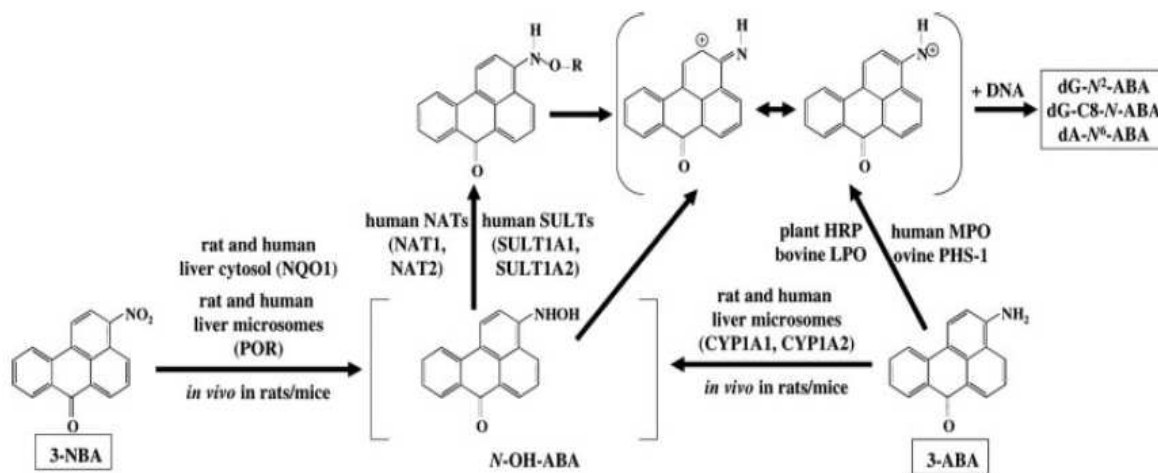
Konjugace N-hydroxylaminu s aktivním acetátem nebo sulfátem, probíhající v druhé fázi biotransformace, usnadňuje tvorbu nitréniového iontu. Tyto reakce jsou v lidském organismu katalyzovány N,O-acetyltransferasami (NAT), převážně NAT2 a v menší míře NAT1, a sulfottransferasami (SULT), převážně SULT1A1 a SULT1A2. Všechny tyto enzymy NAT1, NAT2 stejně jako SULT1A1 a SULT1A2 se vyskytují v buňkách dýchacích cest a NAT2 a SULT1A1 jsou obsaženy i v buňkách lidských jater. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Bieler *et al.*, 2007]

N-OH-ABA se může dále redukovat až na 3-ABA, nalezený v moči populace vystavené působení dieselových exhalátů. Tato sloučenina je hlavním metabolitem 3-NBA. Naopak, 3-ABA může být také zpětně oxidován na N-OH-ABA. Oxidace 3-ABA může být tedy aktivační cestou této sloučeniny, vedoucí ke tvorbě aduktů s DNA. V jaterních mikrosomech je tato reakce katalyzována cytochromy P450 (CYP), a to především CYP1A1 a CYP1A2, které jsou majoritními enzymy katalyzující tuto reakci. Kromě jaterní tkáně tyto enzymy aktivují 3-ABA i v plicích a ledvinách. Schopnost aktivovat 3-ABA mají též enzymy jaterního cytosolu, plic a ledvin, ve

kterých se CYP1A1/2 téměř nevyskytují. V těchto orgánech je pak tato reakce katalyzována peroxidasami. Dalším substrátem peroxidas je peroxid vodíku, který může být dodáván xanthinoxidasou, savčí nitroreduktasou schopnou aktivovat 3-NBA. Mezi peroxidasy aktivující 3-NBA patří prostaglandin H synthasa (PHS, neboli cyklooxygenasa, COX), myeloperoxidasa (MPO), laktoperoxidasa (LPO) nebo křenová peroxidasa (HRP). [Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009]

PHS i MPO jsou exprimovány v plicích, které jsou vystaveny působení 3-NBA primárně, neboť 3-NBA vstupuje do organismu převážně inhalační cestou. Dále se PHS hojně vyskytuje i v močových cestách, kde může aktivovat i jiné genotoxikanty než je 3-NBA. MPO se také vytváří v primárních granulích neutrofilů, ze kterých se do plic dostává po chemickém nebo biochemickém poškození těchto buněk. MPO spolu s LPO mohou být také exprimovány v prsní tkáni epiteliálními buňkami a jsou i součástí mateřského mléka. Stejně jako jiné lipofilní látky se 3-ABA může akumulovat v tukových tkáních, jako je prsní tkáň, a přetrvávat zde v závislosti na množství aktivujících enzymů (MPO a/nebo LPO). [Stiborová *et al.*, 2005a]

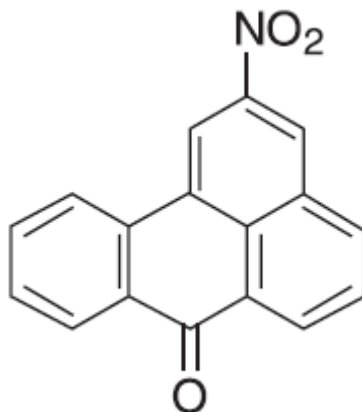
Při oxidaci 3-ABA peroxidasami mohou také vznikat volné radikály, které mohou přispívat k jeho mutagenitě či karcinogenitě v promoční fázi karcinogeneze. [Stiborová, 2002; Stiborová *et al.*, 2005a]



Obr. 25 Metabolická aktivace 3-NBA a 3-ABA vedoucí k tvorbě aduktů s DNA. NQO1 = NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa, CYP = cytochrom P450, POR = NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, NAT = N,O-acetyltransferasa, SULT = sulfotransferasa, R = -COCH₃ nebo -SO₃H [Stiborová *et al.*, 2006]

1.7 2 – Nitrobenzanthron

2-Nitrobenzanthron (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) (**Obr. 26**) je další polycyklickou aromatickou nitrosloučeninou nalezenou jako polutant znečištěného ovzduší.



Obr. 26 Vzorec 2-nitrobenzanthronu

2-NBA je izomerem 3-NBA, který byl detekován ve znečištěném ovzduší v koncentracích výrazně vyšších než v případě 3-NBA. Např. v jednom vzorku vzduchu byla koncentrace 2-NBA 495 pg/m³ a 3-NBA 6,8 pg/m³. Jejich poměr, 2-NBA/3-NBA, byl tedy 70. [Arlt, 2005] 2-NBA vzniká převážně procesy probíhajícími v atmosféře, zatímco 3-NBA, vyskytující se hlavně ve výfukových plynech, je tvořen při spalovacích procesech. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007; Čechová, 2010]

Genotoxicita obou látek byla testována řadou experimentů *in vitro* a *in vivo* v organismu laboratorního potkana. Z těchto experimentů vyplývá, že i 2-NBA může vytvářet adukty s DNA. Ve srovnání s 3-NBA je však schopnost tvorby aduktů s DNA pro 2-NBA jen velmi nízká, a proto je 2-NBA sloučeninou pouze slabě toxickou. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2007; Čechová, 2010]

Této problematice se věnujeme i v naší laboratoři. Poslední výsledky ukazují, že 2-NBA není dobrým substrátem enzymů, které aktivují 3-NBA (NQO1, XO, NADPH:CYP reduktasa). [Stiborová *et al.*, 2010a] V experimentech *in vitro*, využívajících tyto enzymové systémy, bylo pozorováno, že oproti 3-NBA, 2-NBA tyto enzymy neaktivují (netvoří se adukty s DNA). [Stiborová *et al.*, 2010a] Otevřenou

otázkou tedy je, jakými enzymovými systémy je 2-NBA metabolizován v nádorových buněčných liniích, kde adukty s DNA byly detekovány. [Arlt *et al.*, 2007]

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu dvou aromatických nitrosloučenin, karcinogéního vzdušného polutantu 3-nitrobenzanthronu (3-NBA) a jeho izomeru 2-nitrobenzanthronu (2-NBA). Konkrétními cíli bylo:

- Studium metabolismu 3-NBA a 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolom a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) za anaerobních aerobních podmínek.
- Studium metabolismu 3-NBA a 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy dvou myších linií - kontrolních („Wild Type“ - WT) a s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy („Hepatic Reductase Null“ - HRN) za anaerobních a aerobních podmínek.
- Studium aktivace 3-NBA a 2-NBA za tvorby aduktů s DNA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolom a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) za anaerobních podmínek.
- Studium aktivace 3-NBA a 2-NBA za tvorby aduktů s DNA jaterními mikrosomálními systémy dvou myších linií – kontrolních („Wild Type“ - WT) a s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy („Hepatic Reductase Null“ - HRN) a obou typů myší premedikovaných benzo(a)pyrenem (WT-B(a)P a HRN-B(a)P) za anaerobních podmínek.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 *Materiál a chemikálie*

Použitý materiál a chemikálie pocházejí z následujících zdrojů:

- **Lachner, Česká republika**

ethylacetát

- **J. T. Baker, Nizozemsko**

methanol, acetonitril

- **Lachema Brno, Česká republika**

ethylacetát, methanol, ethanol, dimethylsulfoxid (DMSO), KCl, glycerol

- **Linde, Česká republika**

dusík (g)

- **Sigma, USA**

fenacetin, nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH),
tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), HCl

- 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron a 3-aminobenzanthron – dar Doc. H.H. Schmeisera, Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

- jaterní mikrosomy potkanů a myší izolovány v laboratoři, PřF UK, katedra biochemie

3.2 *Přístroje*

- **Centrifuga:**

Centrifuge 5418, Eppendorf, Německo (úhlový rotor)

K23, Janetzki, Německo (výkyvný rotor)

K24, Janetzki, Německo (úhlový rotor)

Optima LE80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA (úhlový rotor Ti 45)

- **Váhy:**

analytické váhy PESA 40SM-200A, Švýcarsko

předvážky KERN EW600-2M, Německo

- **Systém HPLC:**

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170S/340S, USA

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

kolona: Macherey-Nagel, Německo - nukleosil 100-5 C18 HD (4 x 250 mm)

program Chromeleon™ 6.11 build 490

- **Další přístroje:**

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou, USA - kalibrace přístroje pomocí standardů Hamilton, Švýcarsko

magnetická míchačka KMO2 basic, IKA-WERKE, Německo

Potterův-Elvehjemův homogenizátor

sonikátor ELMasonic E 30 H, P-Lab, Česká republika

vortex MS 1 Minishaker, Schoeller Pharma Praha, Česká republika

vortex Genius 3, IKA, Česká republika

minishaker 1 IKA, Německo

inkubátor Thermomixer compact 5350, Eppendorf, Německo

microshaker typ ML-1

vakuová odparka Speed vac DNA 110, Savant, USA, Acid-Resistant CentriVap Concentrator, Labconco, USA

3.3 Metody

3.3.1 Isolace mikrosomální frakce z jaterní tkáně potkanů

Mikrosomální frakce (mikrosomy, MS) z jaterní tkáně potkanů byly izolovány v rámci diplomové práce následujícím postupem.

Jaterní mikrosomální frakce byla z tkáně získána metodou frakční centrifugace.
6561

Celý postup izolace probíhal v chlazené místnosti při 5 °C a všechny použité nástroje a roztoky byly předem vychlazeny.

V jednotlivých krocích izolace byly použity následující roztoky pufrů:

P1: 153 mM KCl; 50 mM TRIS; 50 µM vit E; pH 7,4

P2: 100 mM Na₄P₂O₇ · 10 H₂O; pH 7,4

P3: 20% glycerol; 153 mM KCl; 50 mM TRIS; 50 µM vit E; pH 7,4

Vyjmutá a opláchnutá játra byla vložena do předem zváženého ledového roztoku pufru P1 a z nárůstu hmotnosti byla určena hmotnost tkáně. Jaterní tkáň byla rozstříhávána na menší díly a několikrát promyta pufrům P1 pro co nejdokonalejší odkrvení. Následně byla tkáň homogenisována nejdříve ve volnějším, následně v těsnějším homogenisátoru dle Pottera a Elvehjema s roztokem P1 o objemu (ml) odpovídajícím 4 x hmotnosti jaterní tkáně (g).

Získané homogenáty byly odstředěny 10 minut při 3000 RPM (centrifuga Janetzki K-23, Německo) ve výkyvném rotoru 4 x 70 ml za chlazení na 4 °C. Supernatanty byly uchovány v chladu a sedimenty rehomogenisovány v roztoku P1 a zpracovány za výše uvedených podmínek.

Spojené supernatanty byly centrifugovány po dobu 20 minut při 13 000 RPM (centrifuga Janetzki K-24, Německo) v úhlovém rotoru 6 x 35 ml za chlazení na 4 °C. Získaná peleta představovala mitochondriální frakci. K dalšímu zpracování byl použit supernatant, který byl opatrně oddělen od této, tzv. „lehce sedlé“, vrstvy .

Z takto získaných supernatantů byly připraveny mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při 45 000 RPM (centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 94 ml). Supernatanty po centrifugaci jsou cytosolárními frakcemi. (Tyto frakce byly zmrazeny v kapalném dusíku a uchovány při -80 °C). Pelety mikrosomů byly resuspendovány v pufru P2.

Z homogenních suspenzí sedimentu byly připraveny finální mikrosomální frakce ultracentrifugací 65 minut při 60 000 RPM (centrifuga Beckman LE-80K, úhlový rotor 45 Ti, 6 x 94 ml). Mikrosomální sedimenty byly resuspendovány v pufru P3. Výsledné mikrosomální preparáty byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při teplotě -80 °C.

3.3.2 Metody používané ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA

Ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA byly použity jaterní mikrosomální systémy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat (potkanů) a jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN).

Dále byly prováděny experimenty s jaterními mikrosomálními systémy myší, jednak nepremedikovaných žádným induktorem CYP (kontrolní) – myší linie WT („Wild Type“), jednak geneticky modifikovaných „knock-out“, u kterých v játrech absentovala NADPH:CYP reduktasa – myší linie HRN („Hepatic Reductase Null“).

Koncentrace proteinů v jednotlivých jaterních mikrosomálních systémech použitých pro experimenty jsou uvedeny v následující tabulce (**Tabulka 3**).

Tabulka 3 Koncentrace proteinů v jaterních mikrosomálních systémech použitých pro experimenty. (MS - mikrosomy)

Jaterní mikrosomální systémy	Koncentrace proteinu [mg/ml]
Sudan I-MS	64,0
β -NF-MS	54,3
PB-MS	29,3
EtOH-MS	21,5
PCN-MS	52,8
WT-MS	34,9
HRN-MS	40,4

3.3.2.1 Metody používané ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA za aerobních podmínek

Inkubační směs:

- pufr - 50 mM TRIS/HCl, pH 7,5
- 10 mM NADPH
- mikrosomy (0,5 mg proteinu/ml) (**Tabulka 3, str. 48**)
- 2 mM 3-NBA (resp. 2-NBA) v DMSO

Inkubační směs o objemu 500 μ l měla následující složení: pufr (50 mM TRIS/HCl, pH 7,5), 50 μ l 10 mM NADPH a mikrosomy v takovém množství, aby inkubační směs obsahovala 0,5 mg proteinu/ml.

Reakce byla startována přidáním 5 μ l 2 mM 3-NBA (resp. 5 μ l 2 mM 2-NBA) a inkubována po dobu 60 minut za stálého třepání 400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) v otevřených mikrozkuřavkách při 37°C.

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml ethylacetátu a následným intenzivním protřepáním.

Dále bylo přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu jako vnitřního standardu pro HPLC.

Produkty reakce byly extrahovány do ethylacetátu intenzivním třepáním (2 minuty) (Microshaker ML-1).

Směs byla centrifugována 3 minuty při 13 000 RPM (Centrifuge 5418, Eppendorf).

Po oddělení organické fáze obsahující produkty reakce byl k vodné fázi přidán opět 1 ml etylacetátu a provedena další extrakce stejným postupem.

Spojené extrakty byly odpařeny na vakuové odparce (Acid-Resistant CentriVap Concentrator, Labconco).

Těsně před analýzou byly vzorky rozpuštěny ve 25 μ l methanolu. Metabolity byly separovány pomocí HPLC (viz kap. 3.3.3).

3.3.2.2 Metody používané ke studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA za anaerobních podmínek

Inkubační směs:

- pufr - 50 mM TRIS/HCl, pH 7,5
- 10 mM NADPH
- mikrosomy (0,5 mg proteinu/ml) (**Tabulka 3, str. 48**)
- 2 mM 3-NBA (resp. 2-NBA) v DMSO

Inkubační směs o objemu 500 μ l měla následující složení: pufr (50 mM TRIS/HCl, pH 7,5), 50 μ l 10 mM NADPH a mikrosomy v takovém množství, aby inkubační směs obsahovala 0,5 mg proteinu/ml.

Inkubační směs byla probublávána plynným dusíkem (2 minuty). Tímto způsobem se v ní a nad ní vytvořilo „redukční“ prostředí.

Reakce byla startována přidáním 5 μ l 2 mM 3-NBA (resp. 5 μ l 2 mM 2-NBA) a inkubována po dobu 60 minut za stálého třepání 400 RPM (Thermomixer compact, Eppendorf) v uzavřených mikrozkuřkách při 37°C.

Další postup byl stejný jako při studiu metabolismu 3-NBA a 2-NBA za aerobních podmínek (viz kap. 3.3.2.1)

3.3.3 Příprava standardního roztoku 3-ABA pro HPLC

K 20 μ l methanolu bylo přidáno 2,5 μ l 2 mM 3-ABA. Takto připravený roztok byl promíchán na vortexu a centrifugován.

3.3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

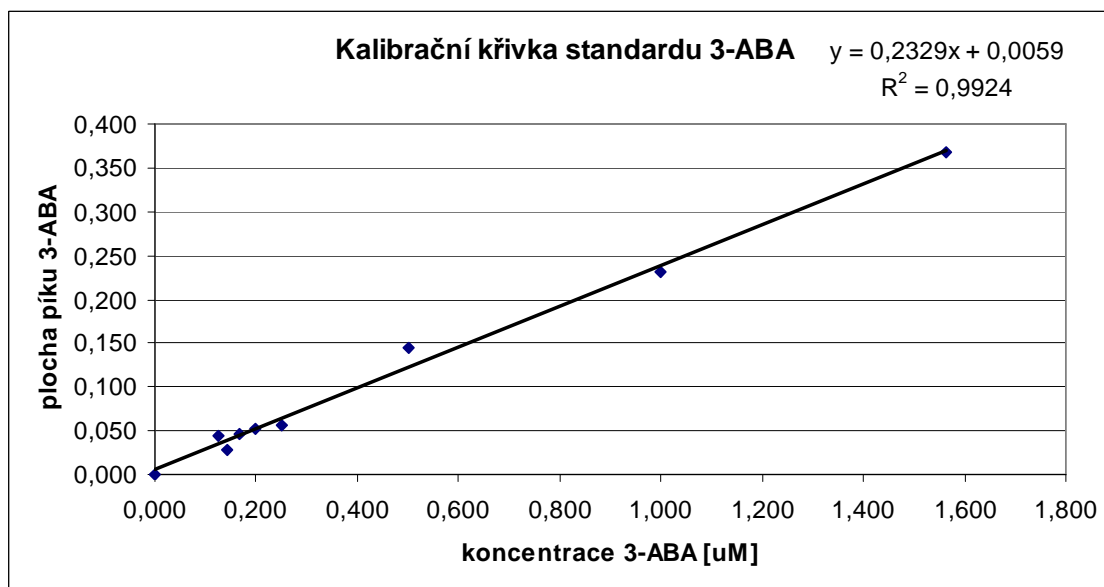
K separaci látek obsažených v jednotlivých inkubačních směsích byla použita metoda RP-HPLC (HPLC s reverzní fází) na koloně C₁₈ (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35°C. Vzorky byly aplikovány v množství 20 μ l. Jako mobilní fáze byl použit 70 % methanol. Mobilní fáze byla pro odstranění vzduchu před analýzou sonikována. Jedna eluce trvala 38 minut při průtoku mobilní fáze 0,6 ml/min a tlaku přibližně 140 bar. Jednotlivé složky inkubační směsi byly detekovány při vlnové délce 254 nm.

3.3.5 Kalibrační křivka standardu 3-ABA

Pro kvantifikaci 3-ABA vznikajícího z 3-NBA jeho inkubací s jaterními mikrosomálními systémy potkanů a myši byla využita kalibrační křivka standardu 3-ABA. (**Obr. 27**) Hodnoty spojnicových bodů této křivky jsou znázorněny v následující tabulce. (**Tabulka 4**)

Tabulka 4 Hodnoty spojnicových bodů kalibrační křivky standardu 3-ABA.

Koncentrace 3-ABA [μM]	Plocha „píku“ 3-ABA
0,00	0,0
0,13	0,04
0,14	0,03
0,17	0,05
0,20	0,05
0,25	0,06
0,50	0,15
1,00	0,23
1,56	0,37



Obr. 27 Kalibrační křivka standardu 3-ABA.

3.3.6 Aktivace 3-NBA a 2-NBA za tvorby aduktů s DNA

Analýsa aduktů 3-NBA a 2-NBA s DNA po jejich redukční aktivaci v jaterních mikrosomálních systémech potkanů a myši byla provedena školitelkou prof. RNDr. Marií Stiborovou, DrSc. metodou „³²P-postlabeling“ v Německém centru pro výzkum rakoviny v Heidelbergu dle postupů, které jsou popsány v dřívějších pracích. [Stiborová *et al.*, 2004]

4 VÝSLEDKY

4.1 *Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů*

Cílem této části diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomy potkana za anaerobních a aerobních podmínek.

Metabolismus 3-NBA byl studován v podmínkách *in vitro* za použití enzymových systémů obsahujících cytochromy P450 (mikrosomů). Pro určení, který z cytochromů P450 se účastní biotransformace 3-NBA, byly využity jednak jaterní mikrosomální systémy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat (potkanů), a také jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných induktory různých cytochromů P450. Přehled používaných mikrosomálních systémů je uveden v následující tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5 Přehled používaných jaterních mikrosomálních systémů potkana. (MS - mikrosomy)

Jaterní mikrosomální systémy potkana	Induktor	Indukovaný cytochrom P450
Kontrolní MS	-	-
Sudan I-MS	Sudan I	CYP1A1/2
β -NF-MS	β -naftoflavon	CYP1A1/2
PB-MS	fenobarbital	CYP2B1/2
EtOH-MS	ethanol	CYP2E1
PCN-MS	pregnenolon 16 α -karbonitrem	CYP3A1/2

4.1.1 **Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních podmínek**

Jak bylo popsáno již v dřívějších pracích [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006, 2008, 2009; Nagy *et al.*, 2007; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008], hlavním redukčním metabolitem 3-NBA je

3-aminobenzanthron (3-ABA), který vzniká redukcí nitro-skupiny ($-\text{NO}_2$) 3-nitrobenzanthronu za tvorby 3-aminobenzanthronu.

Tato část práce se zaměřovala na sledování schopnosti jednotlivých jaterních mikrosomálních systémů potkanů katalyzovat redukcí 3-NBA na 3-ABA.

3-ABA byl od 3-NBA separován metodou HPLC (viz kap. 3.3.4), jeho retenční čas byl určen pomocí standardu 3-ABA (viz kap. 3.3.3).

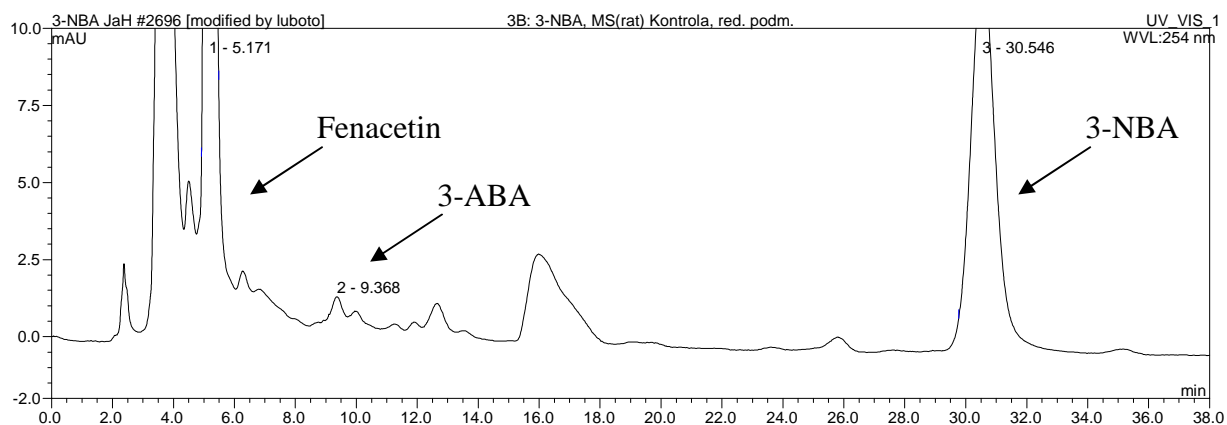
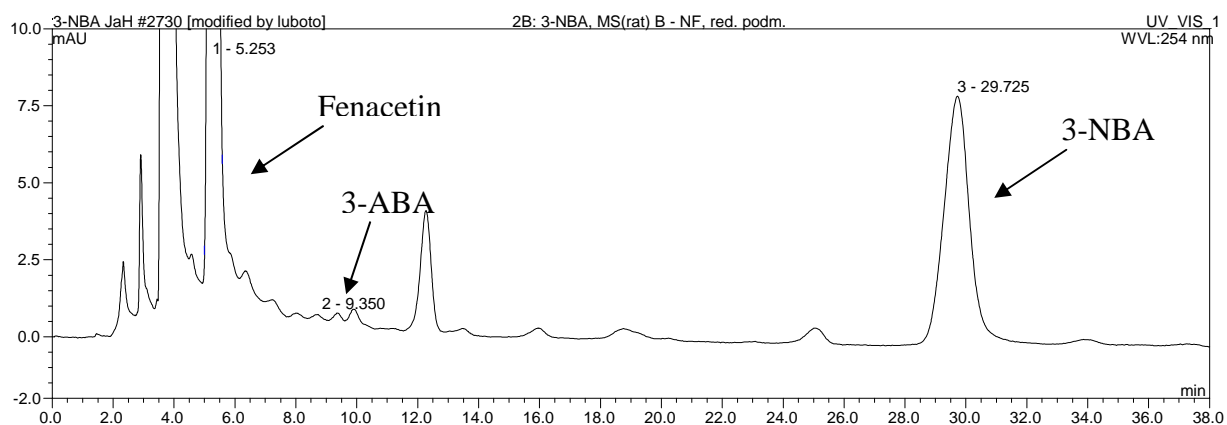
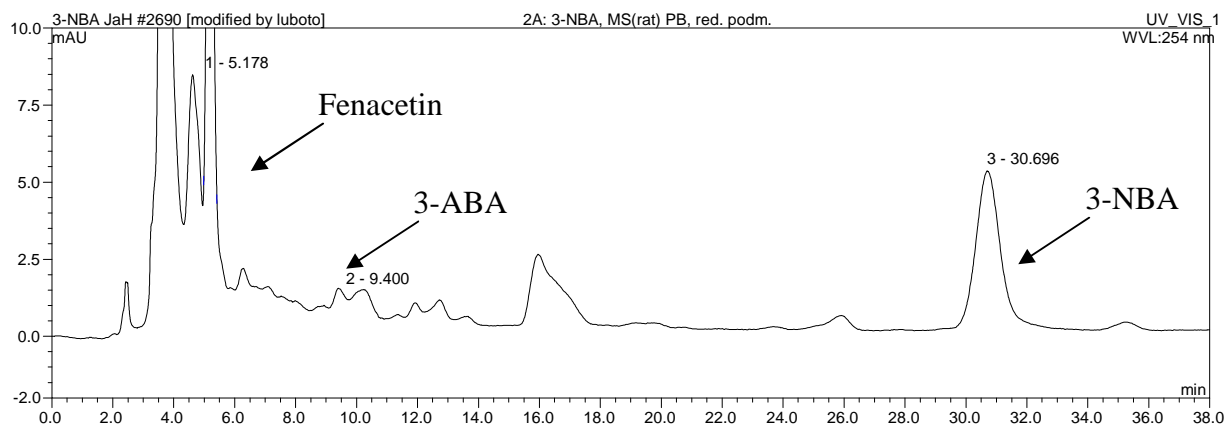
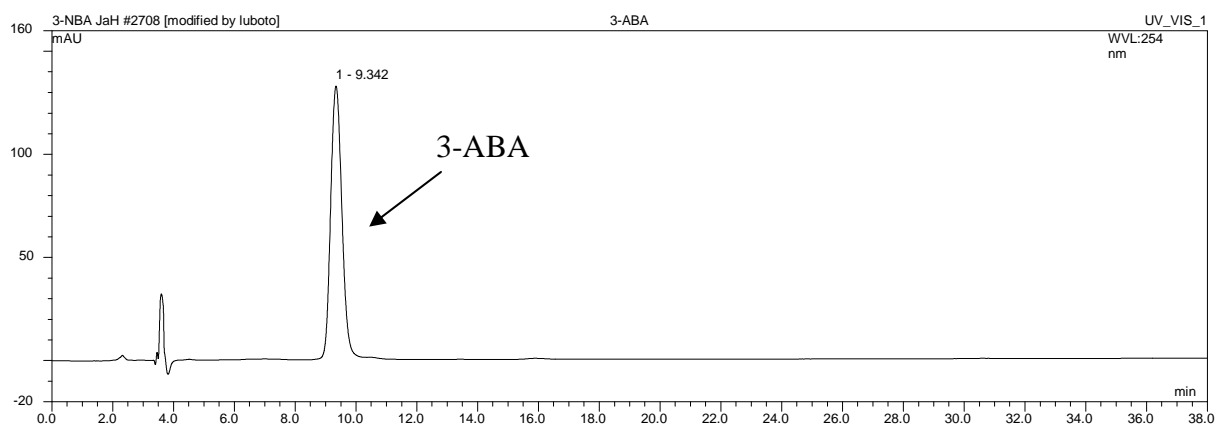
4.1.1.1 Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) za anaerobních podmínek

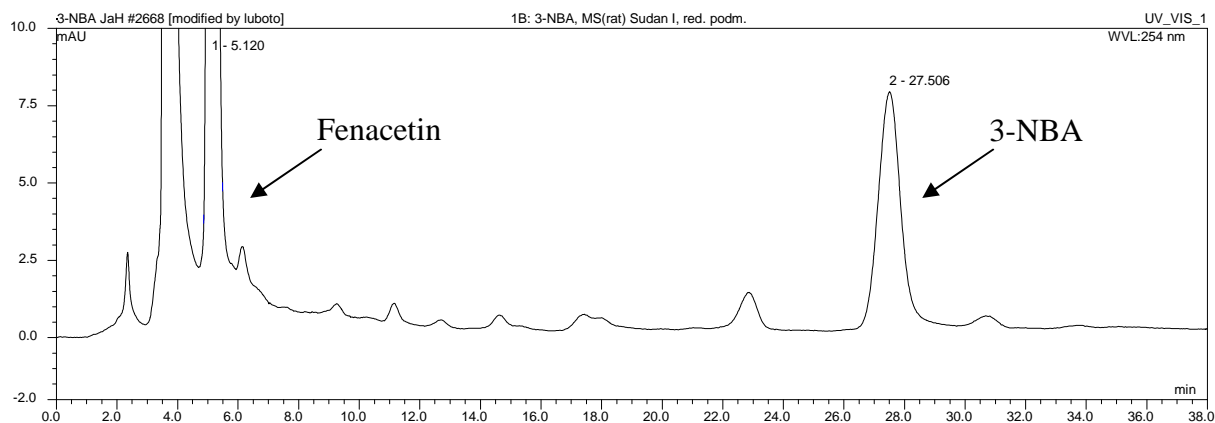
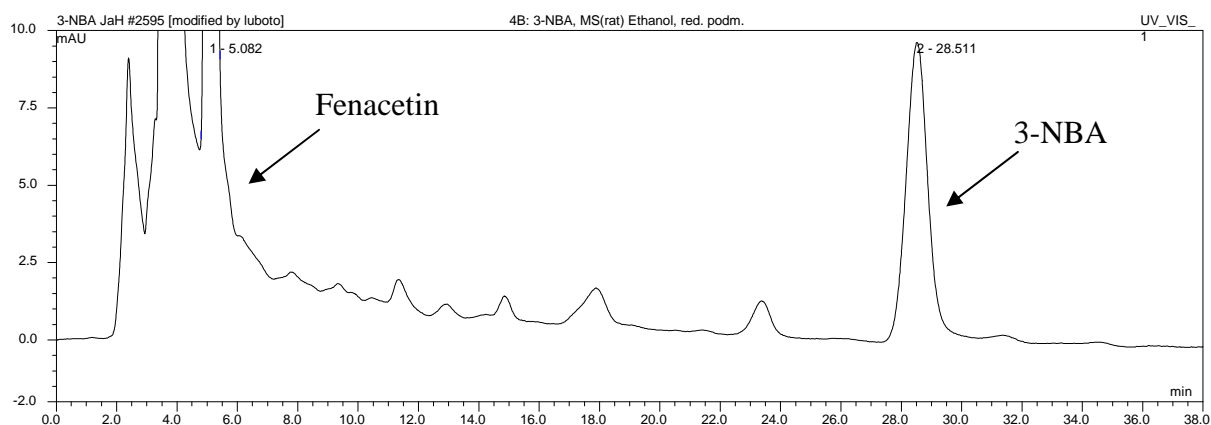
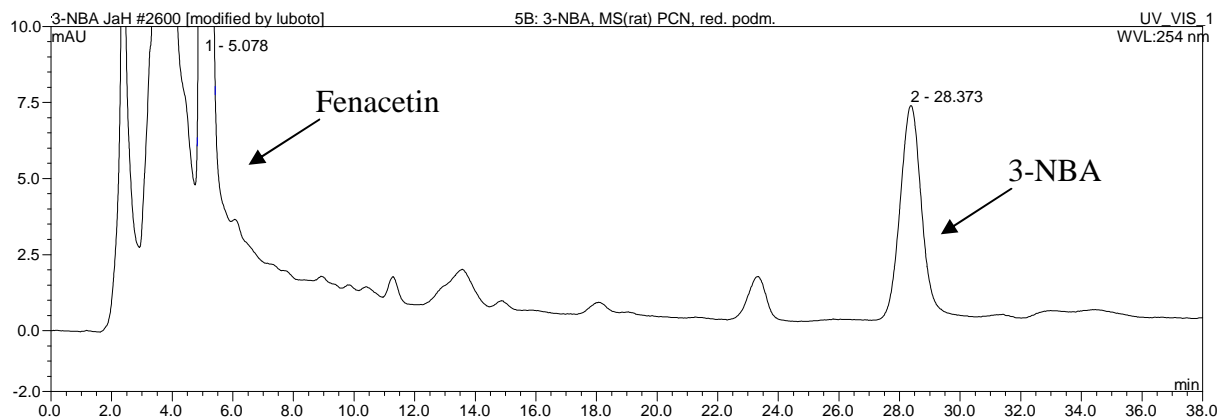
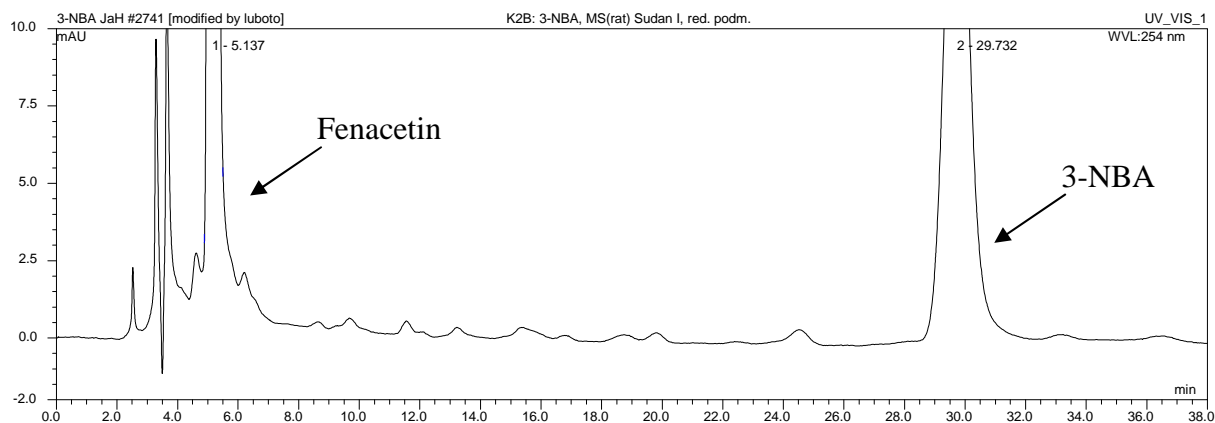
Výsledky získané v experimentech s jaterním mikrosomálním systémem kontrolních, nepremedikovaných potkanů signalizují, že 3-NBA je za anaerobních podmínek tímto systémem redukován. Tvorba redukčního metabolitu 3-ABA byla detekována. (**Obr. 28A, str. 55**) (Chromatogram standardu 3-ABA je znázorněn na **Obr. 28D, str. 55**).

K redukcí 3-NBA za vzniku 3-ABA dochází také jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných β -naftoflavonem (**Obr. 28B, str. 55**) a fenobarbitalem (**Obr. 28C, str. 55**). V případě jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných β -naftoflavonem bylo množství detekovaného redukčního metabolitu 3-ABA ve srovnání s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných fenobarbitalem výrazně menší.

Dále bylo zjištěno, že 3-NBA pravděpodobně není za anaerobních podmínek redukován jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I. Tvorba redukčního metabolitu 3-ABA v systému obsahujícím tyto mikrosomy nebyla detekována. (**Obr. 28E, str. 56**).

Stejně jako v případě jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných Sudanem I nebyl 3-NBA pravděpodobně redukován za vzniku 3-ABA ani v případě jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných ethanolem (**Obr. 28F, str. 56**) a PCN (**Obr. 28G, str. 56**). (Chromatogram kontrolního vzorku jaterního mikrosomálního systému potkana premedikovaného Sudanem I, do jehož inkubační směsi nebyl přidán NADPH, je uveden na obrázku **Obr. 28H, str. 56**).

A**B****C****D**

E**F****G****H**

Obr. 28 HPLC reakčních směsí získaných inkubací 3-NBA s jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních podmínek: **A:** kontrolních (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450), premedikovaných **B:** β -naftoflavonem, **C:** fenobarbitalem, **E:** Sudanem I, **F:** ethanolem, **G:** pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN), **D:** standard 3-ABA (viz kap. 3.3.3), **H:** chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 3-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I bez přidání NADPH. Složení inkubačních směsí viz kap. 3.3.2.2. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 μ l vzorku.

4.1.2 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za aerobních podmínek

Další část diplomové práce se zaměřovala na sledování schopnosti jednotlivých jaterních mikrosomálních systémů potkanů metabolizovat 3-NBA za aerobních podmínek. Vznikající metabolity byly od 3-NBA separovány metodou HPLC (viz kap. 3.3.4).

4.1.2.1 Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) za aerobních podmínek

Výsledky získané v experimentech s jaterním mikrosomálním systémem kontrolních, nepremedikovaných potkanů signalizují, že 3-NBA je za aerobních podmínek oxidován. Byla detekována tvorba dvou různých metabolitů eluovaných v retenčních časech ~13 minut (metabolit X) a ~18 minut (metabolit Y) (**Obr. 29A, str. 59**).

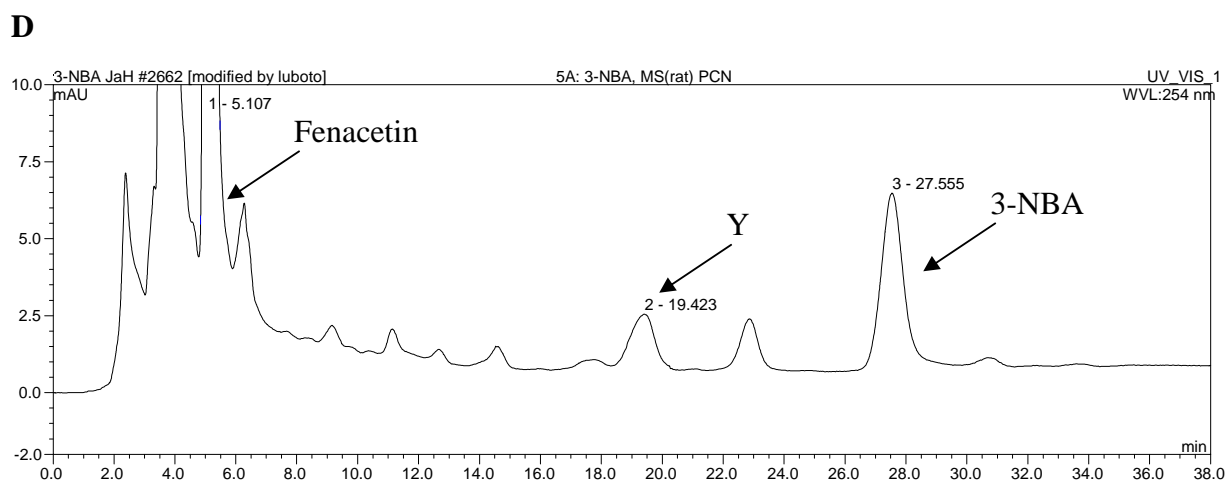
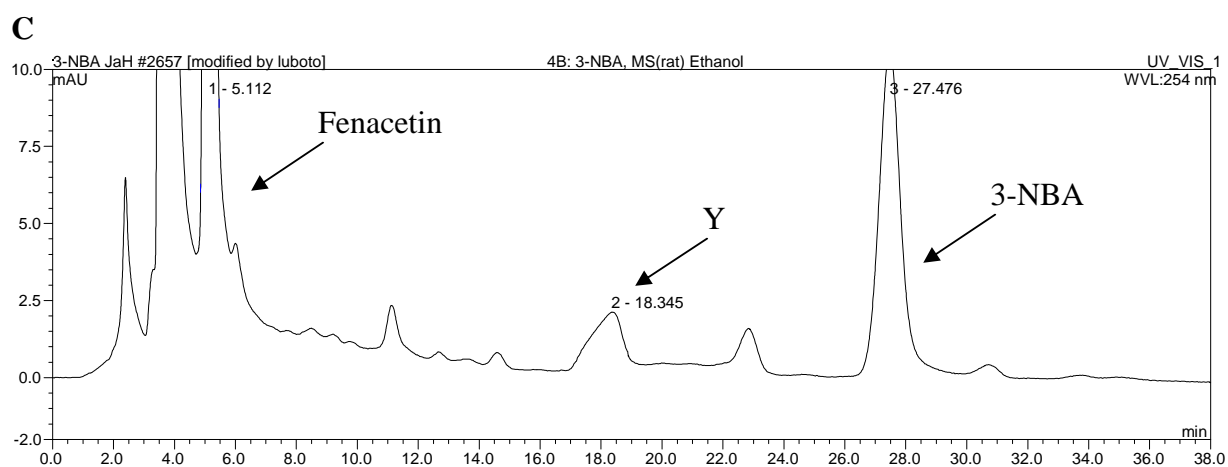
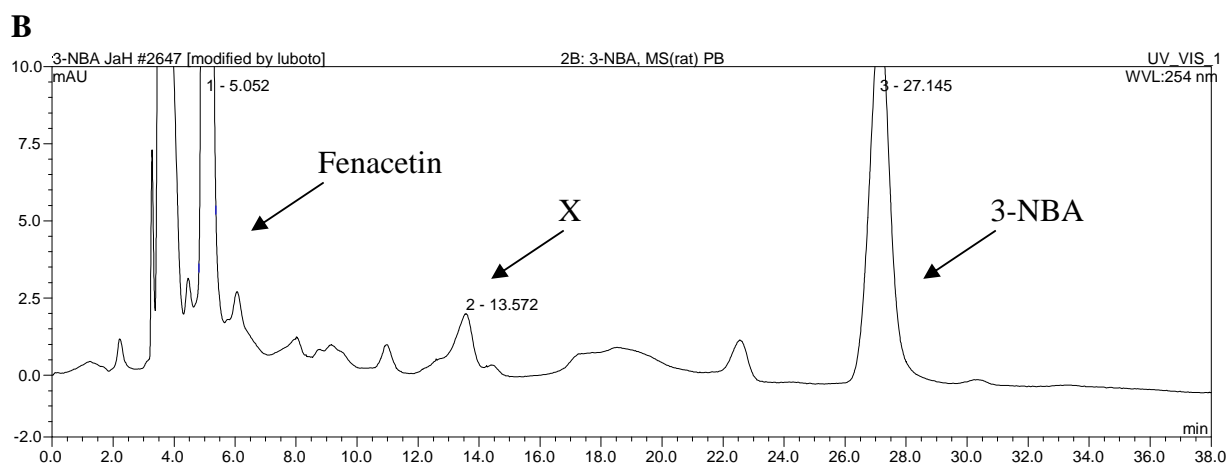
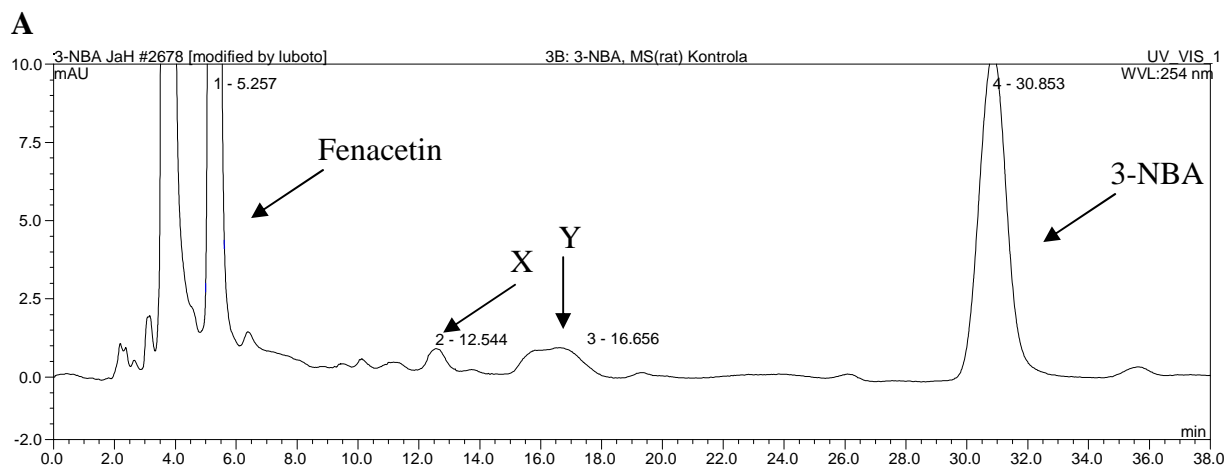
Dále bylo zjištěno, že jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných fenobarbitalem metabolizuje za oxidačních podmínek 3-NBA stejně jako v případě jaterního mikrosomálního systému kontrolních, nepremedikovaných potkanů za tvorby metabolitu eluovaného v retenčním čase ~13 minut (metabolit X) (**Obr. 29B, str. 59**).

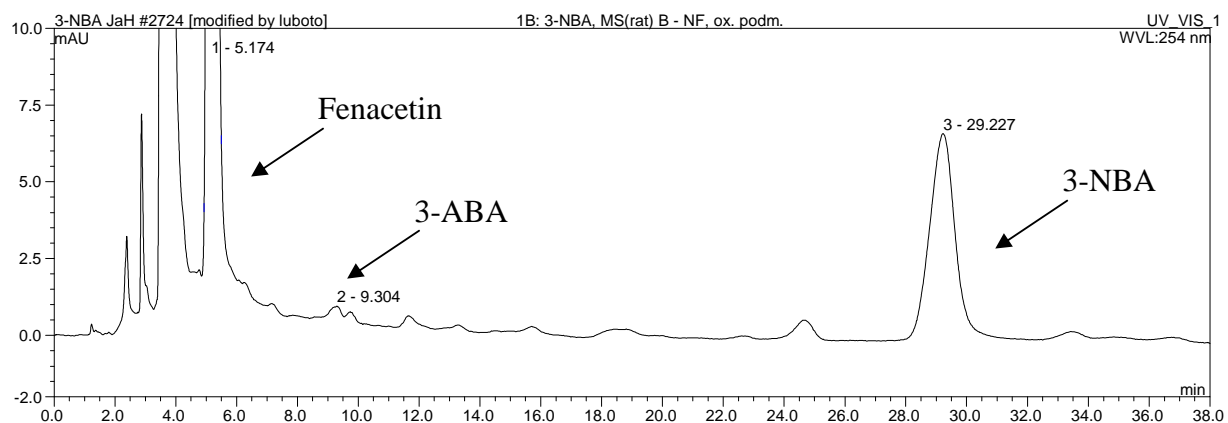
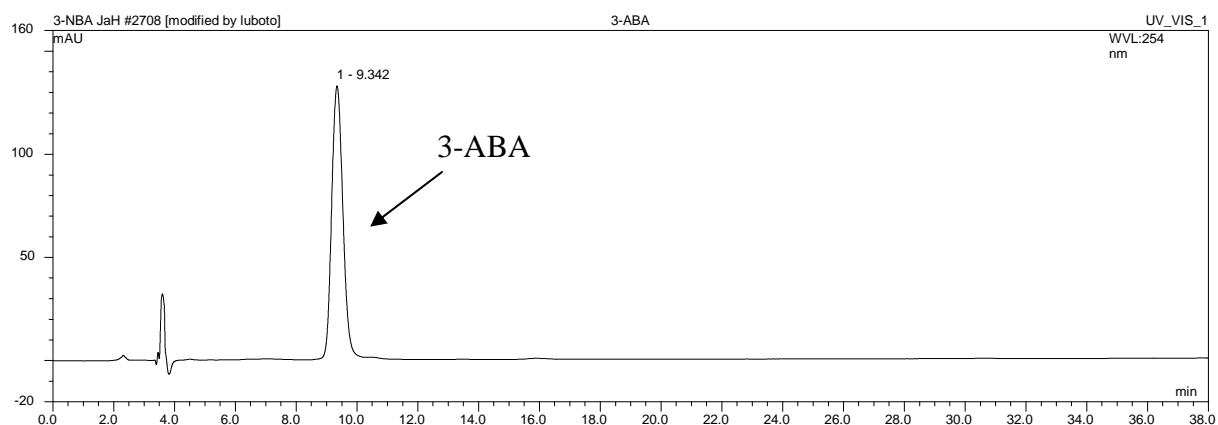
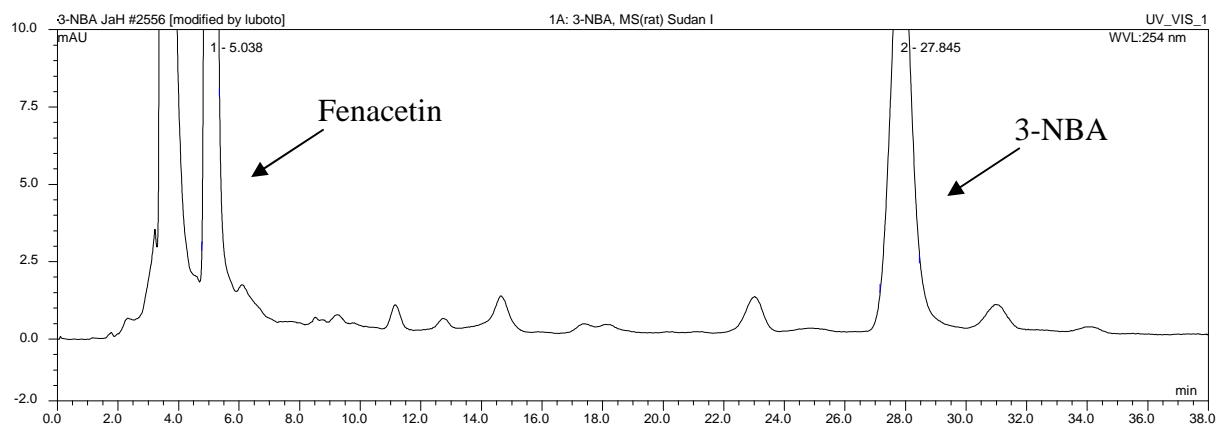
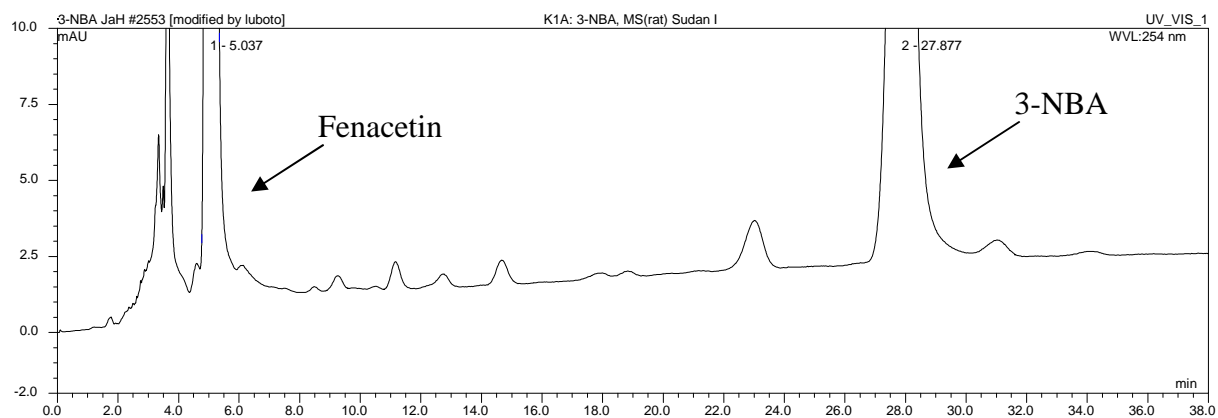
3-NBA je za aerobních podmínek metabolizován také jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných ethanolem (**Obr. 29C, str. 59**) a PCN (**Obr. 29D, str. 59**). V obou případech byly detekované metabolity 3-NBA separovány metodou

HPLC v retenčním čase ~18 minut (metabolit Y) podobně jako při experimentu s jaterním mikrosomálním systémem kontrolních, nepremedikovaných potkanů.

Z výsledků pokusů s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných β -naftoflavonem vyplývá, že 3-NBA není za aerobních podmínek tímto systémem oxidován, ale dochází k jeho redukci a vzniká detekovatelné množství 3-ABA (**Obr. 29E, str. 60**). (Chromatogram standardu 3-ABA je znázorněn na **Obr. 29F, str. 60**).

3-NBA není za aerobních podmínek oxidován jaterním mikrosomálním systémem potkana premedikovaného Sudanem I (**Obr. 29G, str. 60**) (Chromatogram kontrolního vzorku jaterního mikrosomálního systému potkana premedikovaného Sudanem I, do jehož inkubační směsi nebyl přidán NADPH, je uveden na obrázku (**Obr. 29F, str. 60**).



E**F****G****H**

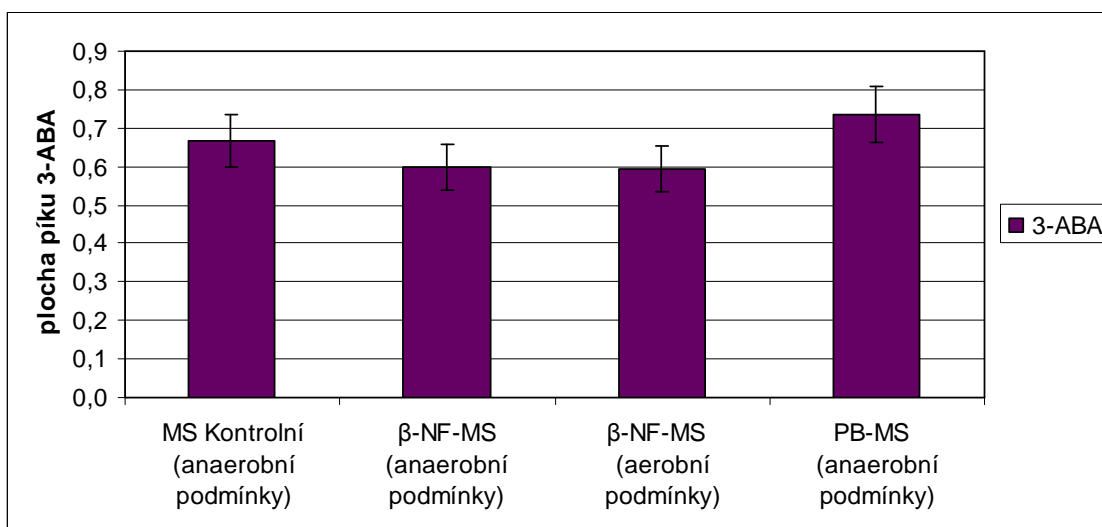
Obr. 29 HPLC reakčních směsí získaných inkubací 3-NBA s jaterními mikrosomálními systémy potkanů za aerobních podmínek: **A:** kontrolních (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450), **B:** premedikovaných fenobarbitalem, **C:** ethanolem, **D:** pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN), **E:** β -naftoflavonem, **G:** Sudanem I, **F:** standard 3-ABA (viz kap. 3.3.3), **H:** chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 3-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných Sudanem I bez přidání NADPH. Složení inkubačních směsí viz kap.3.3.2.1. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 μ l vzorku.

4.1.3 Charakterizace oxidačních a redukčních metabolitů 3-NBA detekovaných v experimentech s jaterními mikrosomálními systémy potkanů

Za anaerobních podmínek je 3-NBA redukován za vzniku 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních, nepremedikovaných potkanů a potkanů premedikovaných β -naftoflavonem a fenobarbitalem.

Za aerobních podmínek byla detekována tvorba 3-ABA v experimentech s jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných β -naftoflavonem.

Z porovnání ploch „píků“ redukčního metabolitu, 3-ABA, tvořeného jednotlivými výše uvedenými jaterními mikrosomálními systémy potkanů vyplývá, že všechny tyto mikrosomy redukují 3-NBA s podobnou efektivitou. Nejefektivněji je 3-NBA redukován za vzniku 3-ABA jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných fenobarbitalem. (**Obr. 30, str. 62**).



Obr. 30 Srovnání přeměny 3-NBA za vzniku redukčního metabolitu 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy kontrolní potkanů (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450) a potkanů premedikovaných β-naftoflavonem a fenobarbitalem za anaerobních a aerobních podmínek. (MS – mikrosomy) Hodnoty v obrázku znázorňují průměry a standardní odchylky ze tří měření.

Koncentrace redukčního metabolitu 3-NBA, 3-ABA, zjištěné z kalibrační křivky standardu 3-ABA (viz kap. 3.3.5), jsou zobrazeny v následující tabulce (**Tabulka 6**).

Tabulka 6 Koncentrace 3-ABA vznikajícího z 3-NBA jeho inkubací s jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních a aerobních podmínek. (MS – mikrosomy, – nedetekováno) Koncentrace 3-ABA a směrodatné odchylky v tabulce jsou výsledky získané ze tří měření.

Jaterní mikrosomální systémy potkanů	Podmínky experimentu	Plocha píku 3-ABA	Koncentrace 3-ABA [μM]
MS Kontrolní	anaerobní	0,7 ± 0,02	5,2 ± 0,1
MS Kontrolní	aerobní	-	0
Sudan I-MS	anaerobní	-	0
Sudan I-MS	aerobní	-	0
β-NF-MS	anaerobní	0,6 ± 0,06	4,6 ± 0,5
β-NF-MS	aerobní	0,6 ± 0,01	4,6 ± 0,1
PB-MS	anaerobní	0,7 ± 0,10	5,8 ± 0,9
PB-MS	aerobní	-	0
EtOH-MS	anaerobní	-	0
EtOH-MS	aerobní	-	0
PCN-MS	anaerobní	-	0
PCN-MS	aerobní	-	0

Za aerobních podmínek byla pozorována eluce dvou „píků“ produktů, které pravděpodobně signalizují tvorbu oxidačních metabolitů 3-NBA. V případě jaterních mikrosomálních systémů potkanů nepremedikovaných a premedikovaných fenobarbitalem byl od 3-NBA metodou HPLC separován metabolit v retenčním čase ~13 minut (metabolit X). V případě jaterních mikrosomálních systémů potkanů nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450 a premedikovaných ethanollem a PCN byl detekován vznik oxidačního metabolitu 3-NBA eluovaného v retenčním čase ~18 minut (metabolit Y).

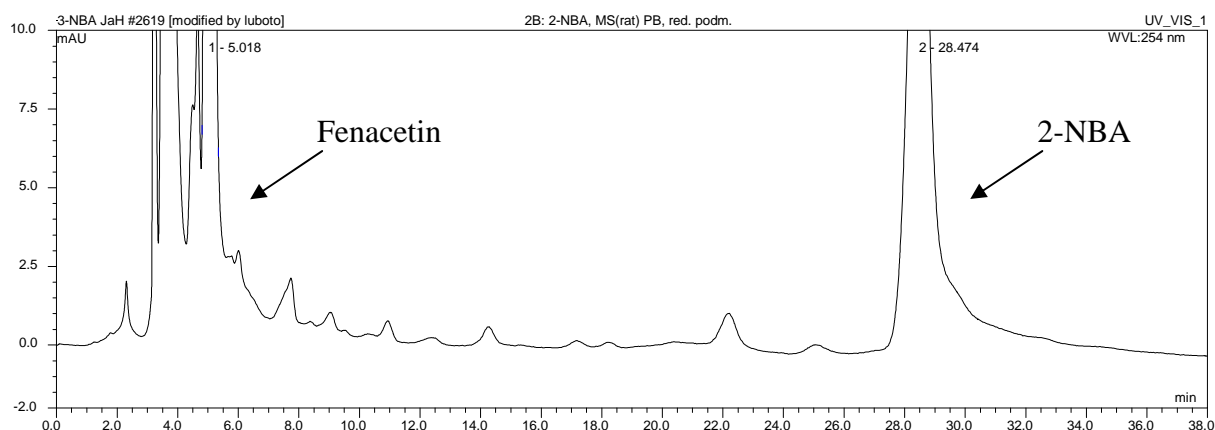
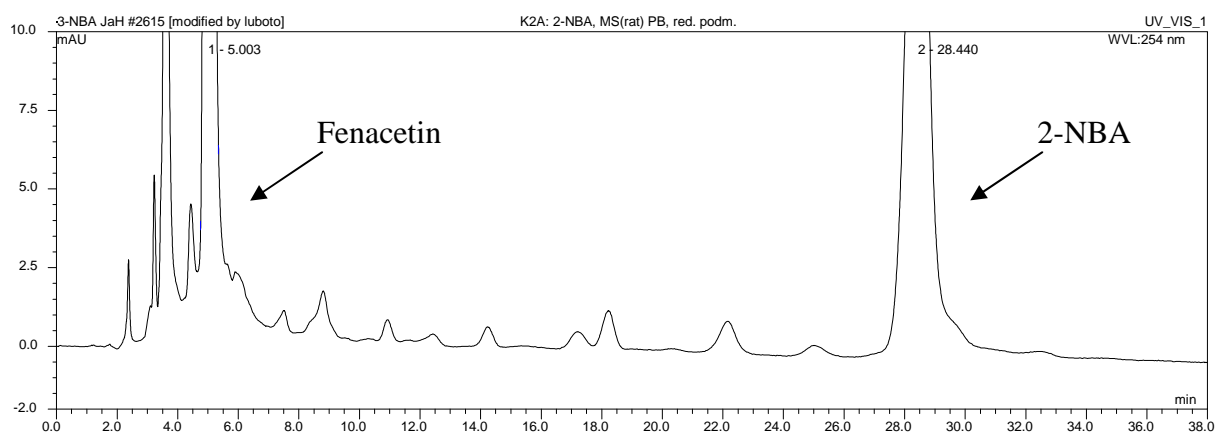
4.2 Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů

Cílem této části diplomové práce bylo potvrdit a rozšířit výsledky experimentů sledujících metabolismus 2-NBA a prováděných v naší laboratoři. [Stiborová *et al.*, 2010a] V nich bylo zjištěno, že 2-NBA pravděpodobně není substrátem enzymů metabolizujících 3-NBA.

Metabolismus 2-NBA byl studován *in vitro* za anaerobních a aerobních podmínek pomocí jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanollem, pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) a mikrosomů nepremedikovaných (kontrolních) potkanů (viz **Tabulka 5, str. 53**).

4.2.1 Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních podmínek

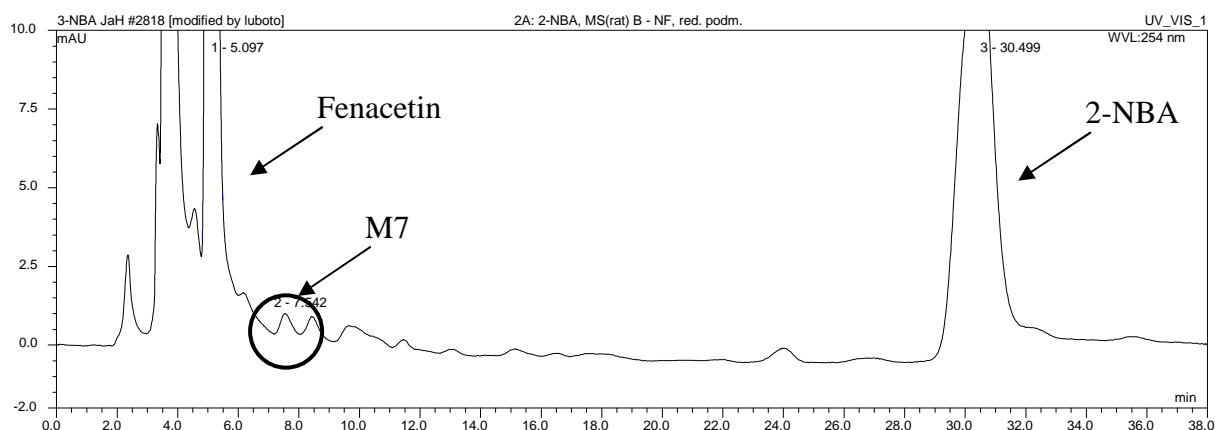
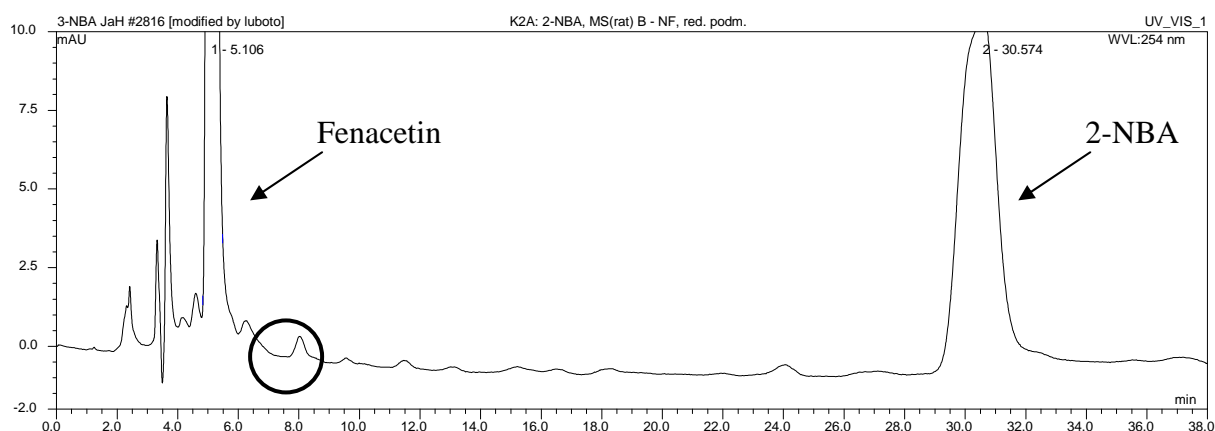
Z výsledků získaných inkubací 2-NBA s mikrosomy vyplívá, že za anaerobních podmínek 2-NBA pravděpodobně nebyl většinou mikrosomů použitých v experimentech metabolizován. Kromě systému premedikovaného β -naftoflavonem, nebyly tvořeny žádné metabolity dalšími používanými jaterními mikrosomálními systémy potkanů (např. jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných fenobarbitalem, **Obr. 31, str. 64**).

A**B**

Obr. 31 HPLC reakční směsi získané inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných fenobarbitalem za anaerobních podmínek (A). B: chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných fenobarbitalem bez přidání NADPH.

Složení inkubační směsi viz kap. 3.3.2.2. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 µl vzorku.

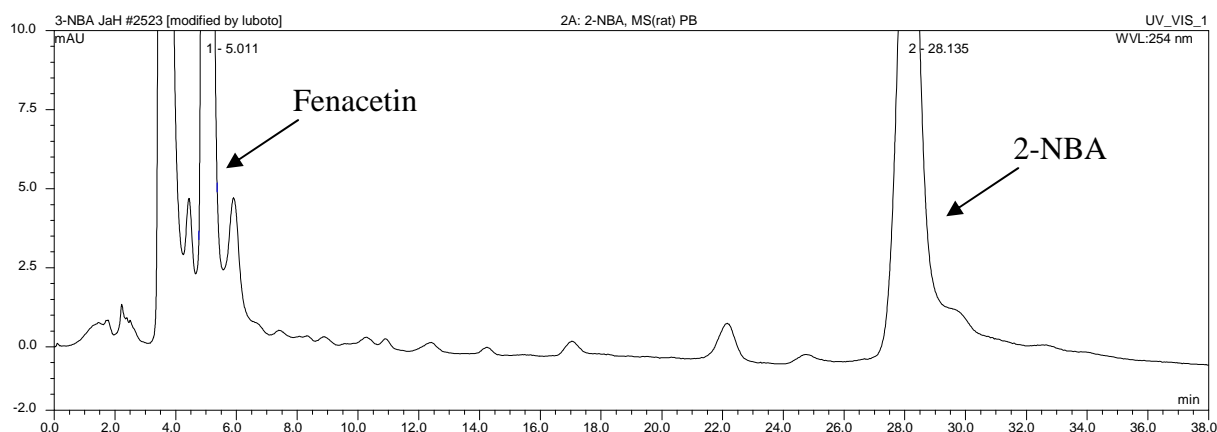
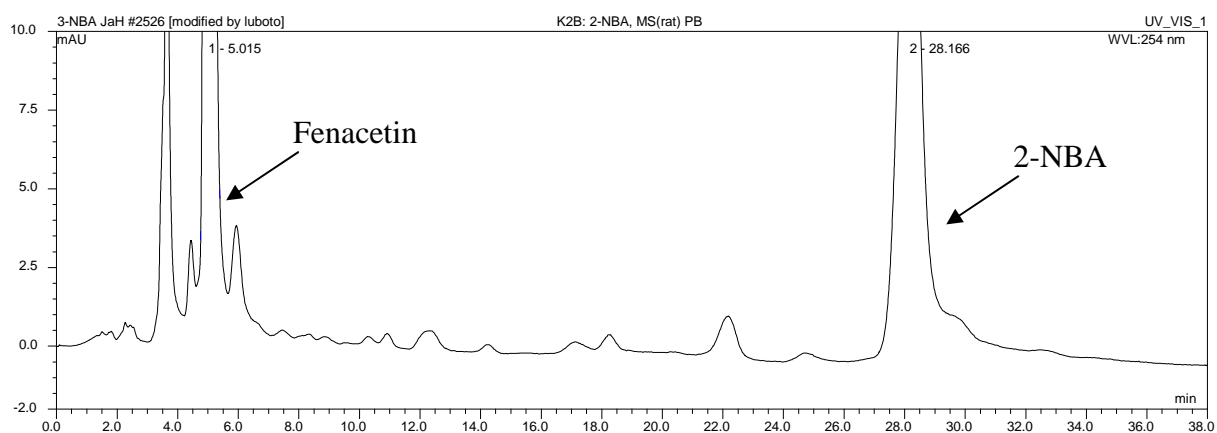
V případě jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných β -naftoflavonem byl metodou HPLC od 2-NBA separován jeden „pík“ eluovaný v retenčním čase 7 minut (metabolit M7) (**Obr. 32, str. 65**). Zdá se, že by tento „pík“ mohl odpovídat metabolitu 2-NBA. V současnosti však nemůžeme prokázat, že se jedná o 2-ABA, neboť nebyla k dispozici uvedena látka jako standard a vzniklé množství metabolitu nebylo dostačující pro jeho další charakterizaci.

A**B**

Obr. 32 HPLC reakční směsi získané inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných β -naftoflavonem za anaerobních podmínek. (A). B: chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných β -naftoflavonem bez přidání NADPH. Složení inkubační směsi viz kap. 3.3.2.2. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 μ l vzorku.

4.2.2 Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy potkanů za aerobních podmínek

Z experimentů s 2-NBA vyplývá, že tato látka není za aerobních podmínek přeměňována žádnými používanými jaterními mikrosomálními systémy potkanů (např. jaterní mikrosomální systém potkanů premedikovaných fenobarbitalem, **Obr. 33, str. 66**).

A**B**

Obr. 33 HPLC reakční směsi získané inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných fenobarbitalem za aerobních podmínek (A). B: chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných fenobarbitalem bez přidání NADPH.

Složení inkubační směsi viz kap. 3.3.2.1. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 µl vzorku.

4.3 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší

Cílem této části práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu 3-NBA za anaerobních a aerobních podmínek také subcelulárními systémy mikrosomů jiného organismu, jmenovitě myši.

Ke sledování přeměn 3-NBA byly použity jaterní mikrosomální systémy myší jednak kontrolních („Wild Type“ - WT) a jednak geneticky modifikovaných

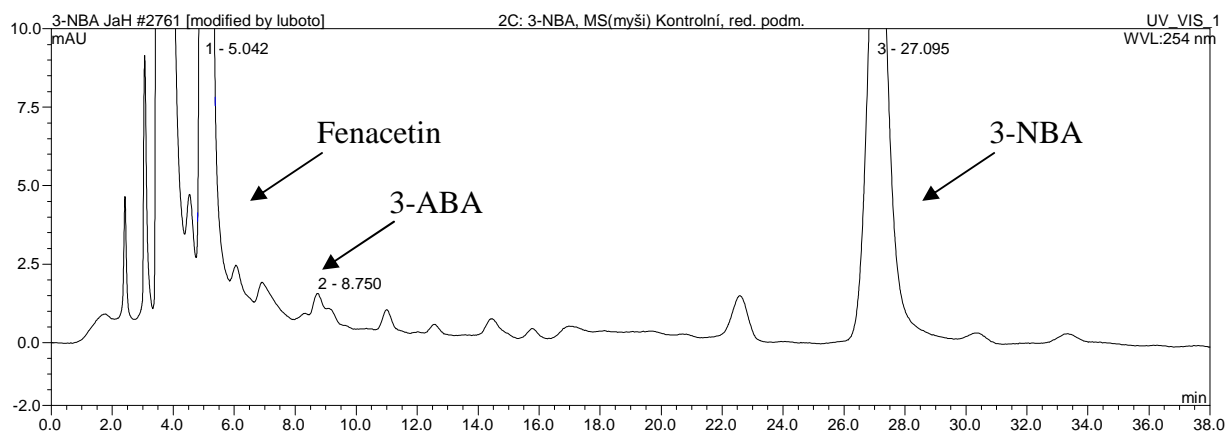
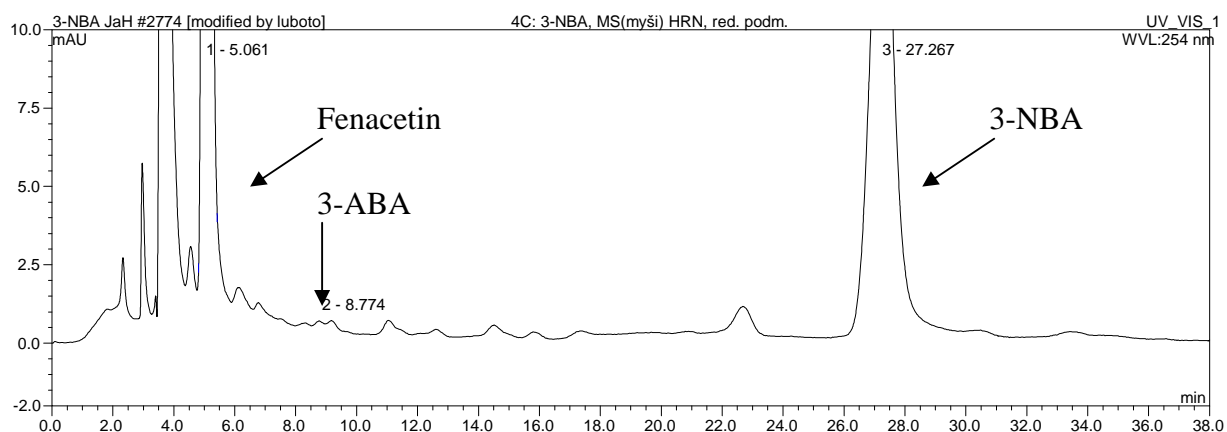
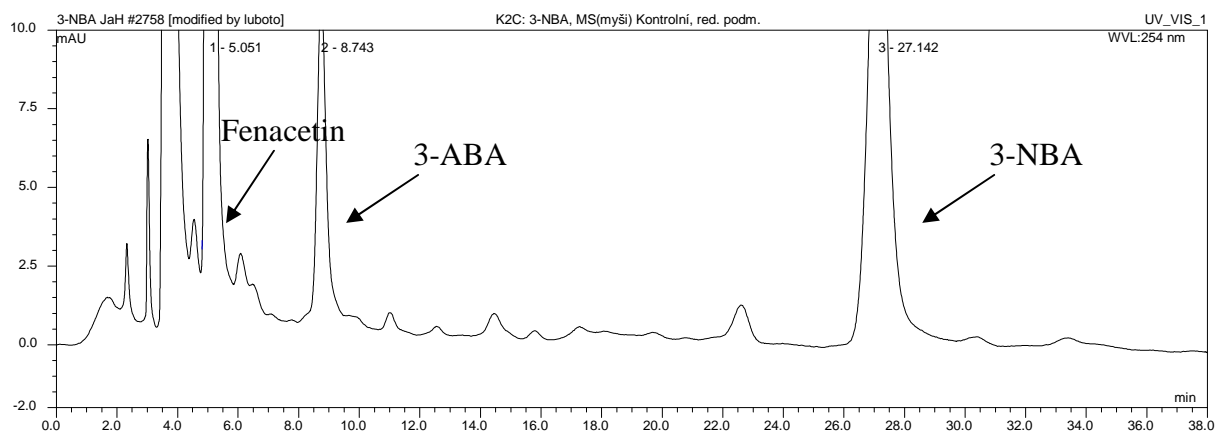
„knock-out“, u kterých v játrech absentovala NADPH:CYP reductasa („Hepatic Reductase Null“ - HRN). Geneticky modifikované myši byly konstruovány v laboratořích spolupracujících institucí ve Velké Británii. [Henderson *et al.*, 2003]

4.3.1 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za anaerobních podmínek.

4.3.1.1 Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních myší a myší s delecí NADPH:cytochrom P450 reductasy za anaerobních podmínek

Výsledky experimentů signalizují, že 3-NBA je za anaerobních podmínek redukován za vzniku 3-ABA oběma používanými jaterními mikrosomálními systémy myší.

V případě jaterního mikrosomálního systému myší linie WT (**Obr. 34A, str. 68**) bylo množství detekovaného redukčního metabolitu 3-ABA ve srovnání s jaterním mikrosomálním systémem myší s delecí NADPH:cytochrom P450 reductasy (**Obr. 34B, str. 68**) výrazně vyšší – více než dvojnásobné. (Chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 3-NBA s jaterním mikrosomálním systémem myší linie WT a přidávkem 0,63 µl standardu 3-ABA (2mM) je znázorněn na **Obr. 34C, str. 68**).

A**B****C**

Obr. 34 HPLC reakčních směsí získaných inkubací 3-NBA s jaterními mikrosomálními systémy myši za anaerobních podmínek: A: linie WT (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450), **B:** linie s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy, **C:** chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 3-NBA s jaterním mikrosomálním systémem myši linie WT a přidavkem 0,63 µl standardu 3-ABA.

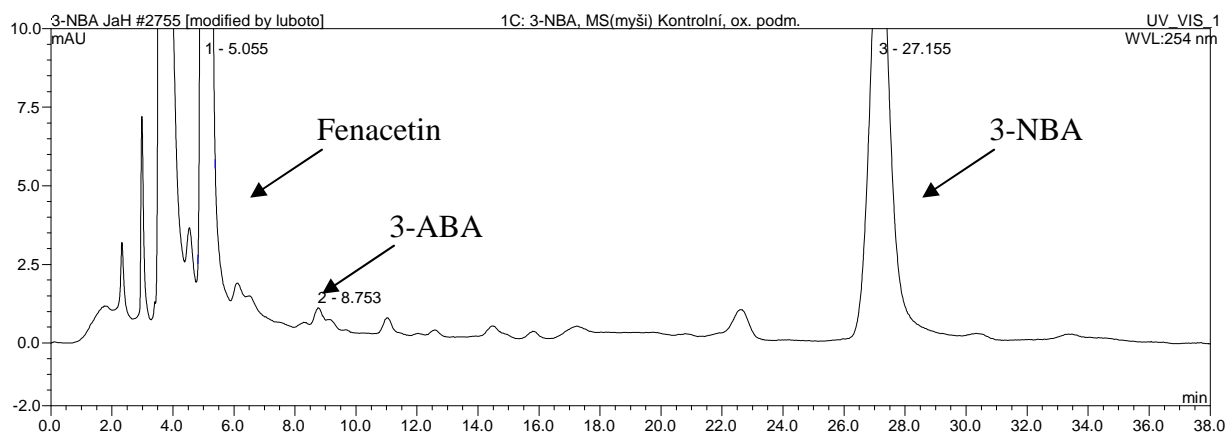
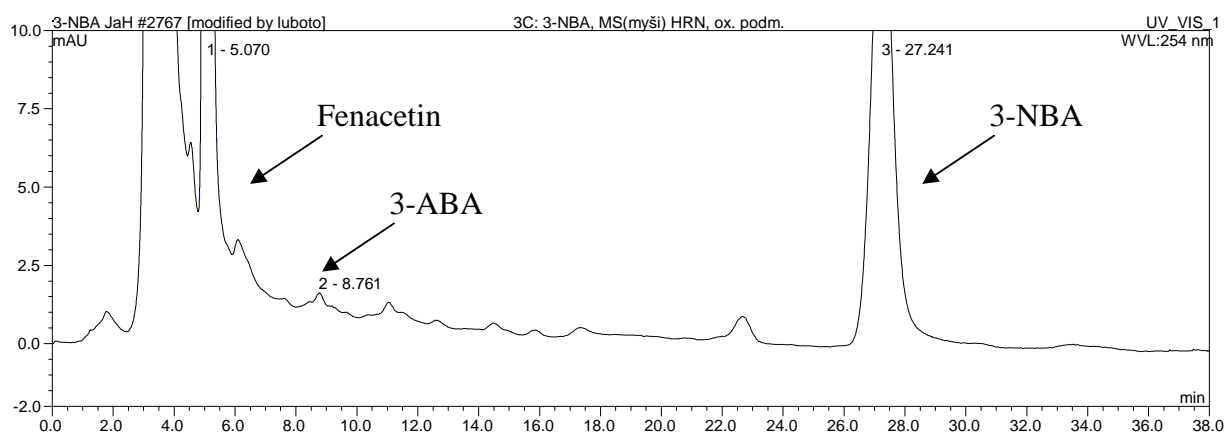
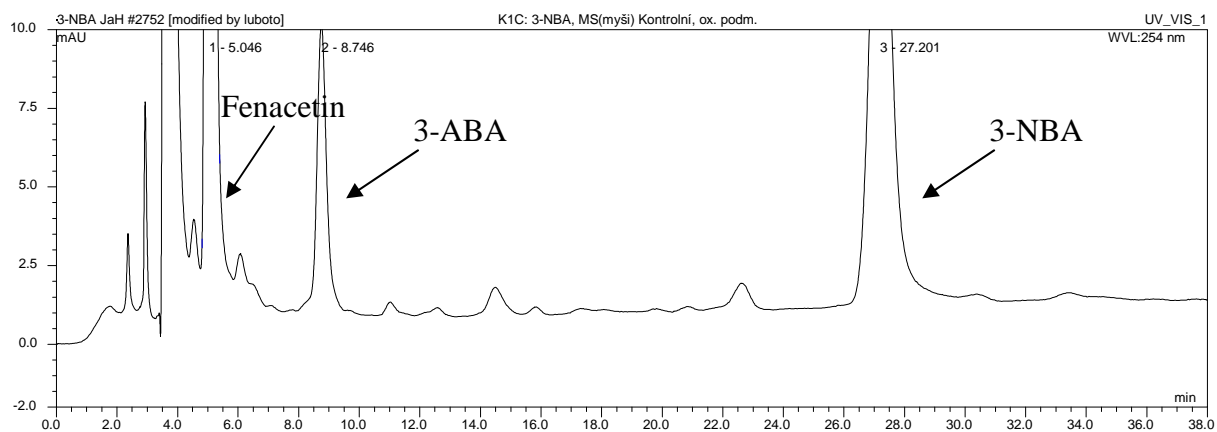
Složení inkubačních směsí viz kap. 3.3.2.2. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 µl vzorku.

4.3.2 Studium metabolismu 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za aerobních podmínek

4.3.2.1 Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomálními systémy kontrolních myší a myší s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy za aerobních podmínek

Z výsledků experimentů vyplývá, že 3-NBA není za aerobních podmínek oxidován žádným používaným jaterním mikrosomálním systémem myší. V obou případech dochází pouze k redukci 3-NBA a vzniká detekovatelné množství 3-ABA.

V případě jaterního mikrosomálního systému myší linie WT (**Obr. 35A, str. 70**) bylo opět množství detekovaného redukčního metabolitu 3-ABA ve srovnání s jaterním mikrosomálním systémem myší s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy (**Obr. 35B, str. 70**) vyšší. (Chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 3-NBA s jaterním mikrosomálním systémem myší linie WT a přidavkem 0,63 μ l standardu 3-ABA (2mM) je znázorněn na **Obr. 35C, str. 70**).

A**B****C**

Obr. 35 HPLC reakčních směsí získaných inkubací 3-NBA s jaterními mikrosomálními systémy myši za anaerobních podmínek: A: linie WT (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450, **B:** linie s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy, **C:** chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 3-NBA s jaterním mikrosomálním systémem myši linie WT a přidavkem 0,63 µl standardu 3-ABA.

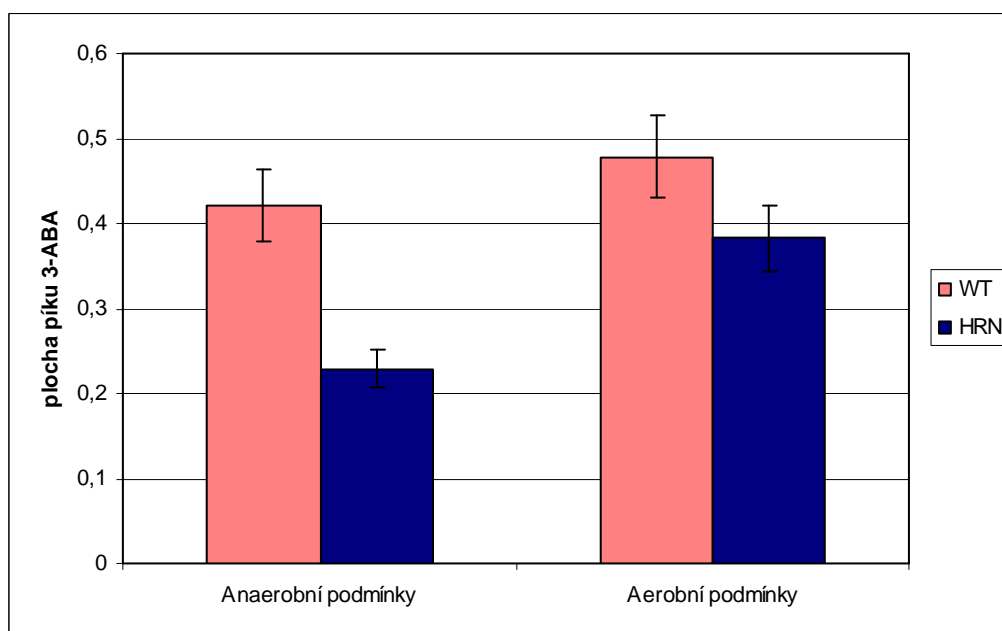
Složení inkubačních směsí viz kap.3.3.2.1. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 µl vzorku.

4.3.3 Kvantifikace detekovaného metabolitu 3-NBA – 3-ABA v experimentech s jaterními mikrosomálními systémy myší

V případě systému myší linie HRN jsme předpokládali sníženou účinnost cytochromů P450 v játrech oproti myší linii WT, z důvodu delece NADPH:CYP reductasy. (viz kap. 1.4.1)

Bylo zjištěno, že jak za anaerobních, tak i za aerobních podmínek, jaterní mikrosomální systém myší linie WT metabolizuje 3-NBA za vzniku 3-ABA efektivněji než mikrosomální systém s deficitem jaterní NADPH:CYP reductasy (HRN).

Dále z výsledků vyplývá, že u obou typů jaterních mikrosomálních systémů myší bylo překvapivě detekováno více redukčního metabolitu 3-ABA za aerobních podmínek než za anaerobních podmínek (**Obr. 36**).



Obr. 36 Srovnání přeměny 3-NBA za vzniku metabolitu 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy myší linie WT a HRN za anaerobních a aerobních podmínek. Hodnoty jsou průměrem tří měření. Hodnoty v obrázku jsou průměry a standardní odchylky ze tří měření.

K výpočtu koncentrace vznikajících metabolitů 3-ABA byla opět použita kalibrační křivka standardu 3-ABA (viz kap. 3.3.5). Výsledky jsou přehledně zobrazeny v následující tabulce (**Tabulka 7, str. 72**).

Tabulka 7 Koncentrace 3-ABA vznikajících z 3-NBA jeho inkubací s jaterními mikrosomálními systémy myší za anaerobních a aerobních podmínek. (MS – mikrosomy) Koncentrace 3-ABA a směrodatné odchylky v tabulce byly určeny ze tří měření.

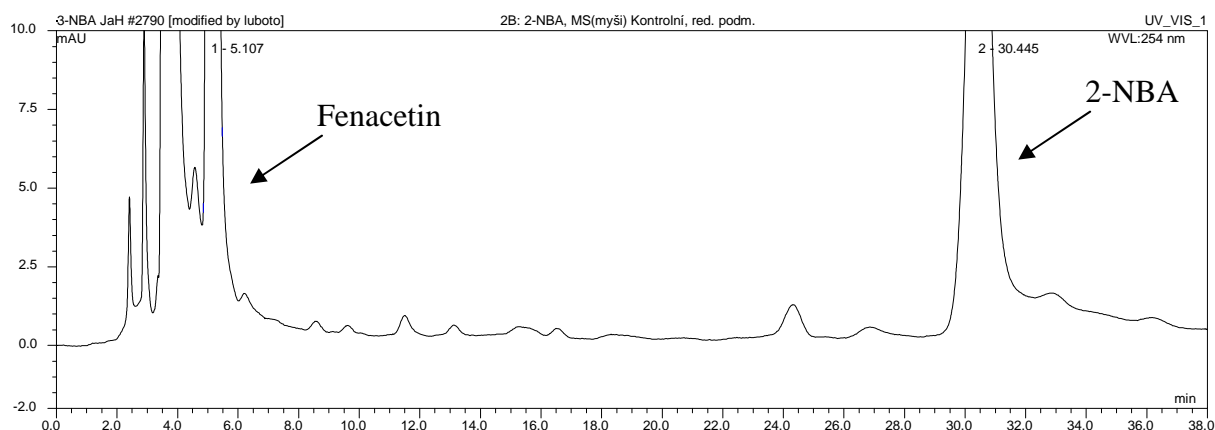
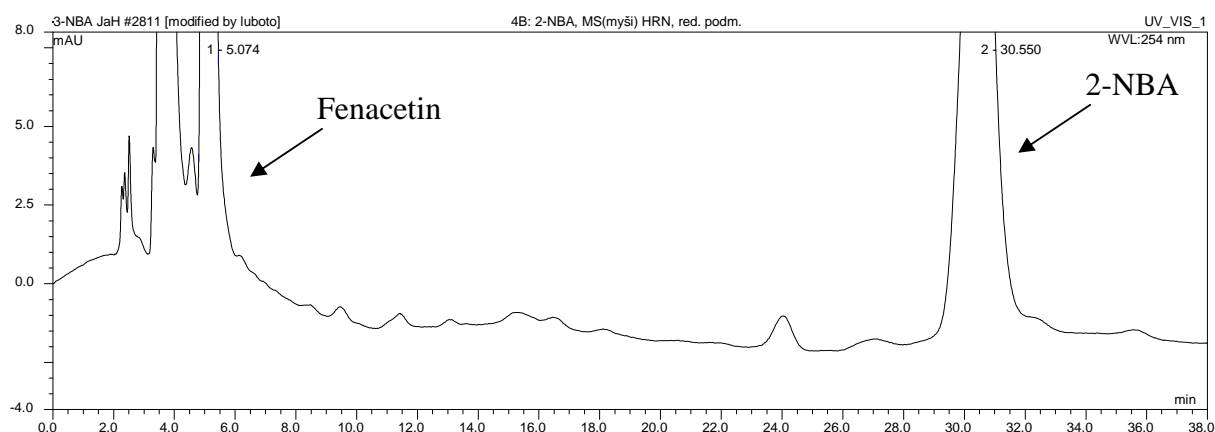
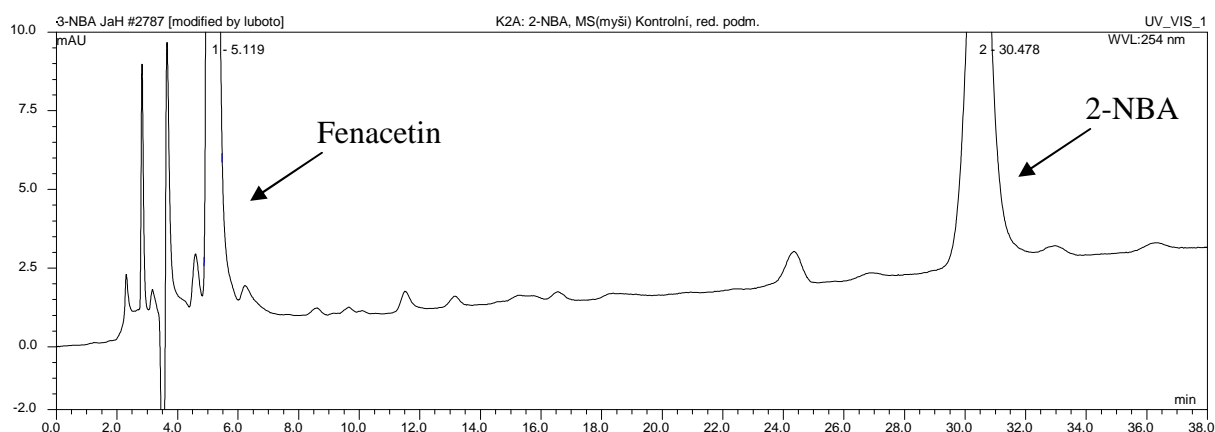
Jaterní mikrosomální systémy myší	Podmínky experimentu	Plocha píku 3-ABA	Koncentrace 3-ABA [μM]
MS Kontrolní	anaerobní	$0,4 \pm 0,11$	$3,1 \pm 0,8$
MS Kontrolní	aerobní	$0,5 \pm 0,04$	$3,6 \pm 0,3$
HRN MS	anaerobní	$0,2 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,2$
HRN MS	aerobní	$0,4 \pm 0,04$	$2,8 \pm 0,3$

4.4 Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší

Ke studiu metabolismu 2-NBA byly opět použity jak jaterní mikrosomální systémy myší linie WT, tak i jaterní mikrosomální systémy myší linie HRN.

4.4.1 Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy myší za anaerobních podmínek

Výsledky pokusů s oběma používanými jaterními mikrosomálními systémy myší ukázaly, že 2-NBA není ani v jednom případě za anaerobních podmínek redukován, nebyla detekována tvorba žádného metabolitu (**Obr. 37, str. 73**).

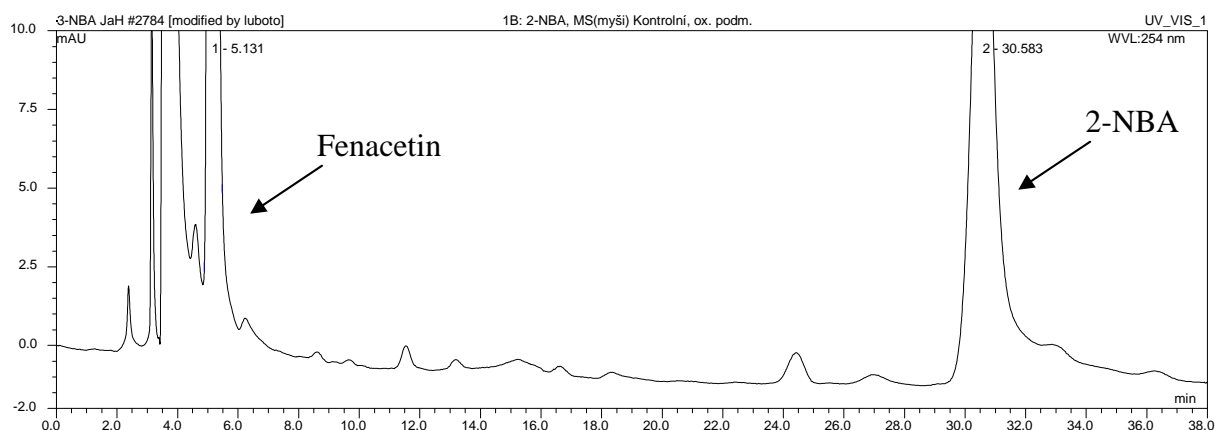
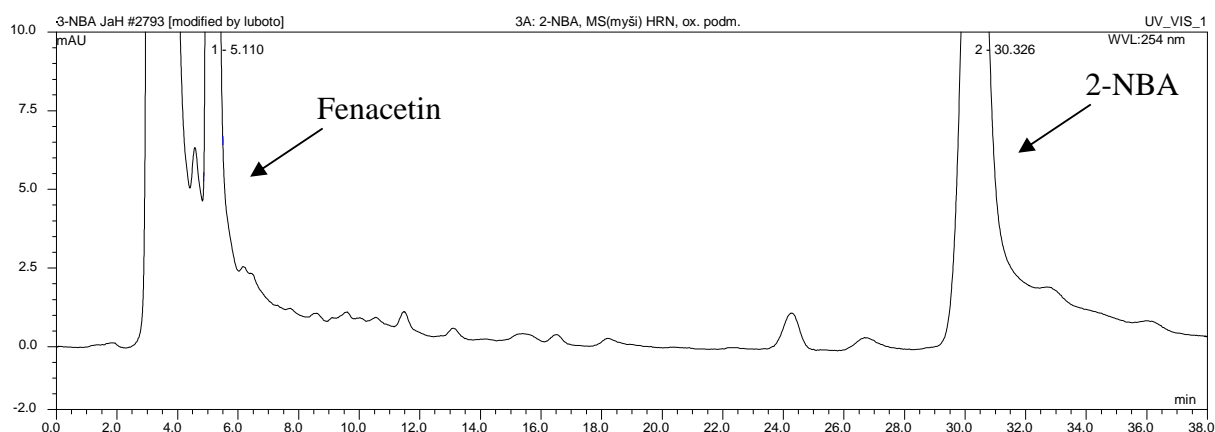
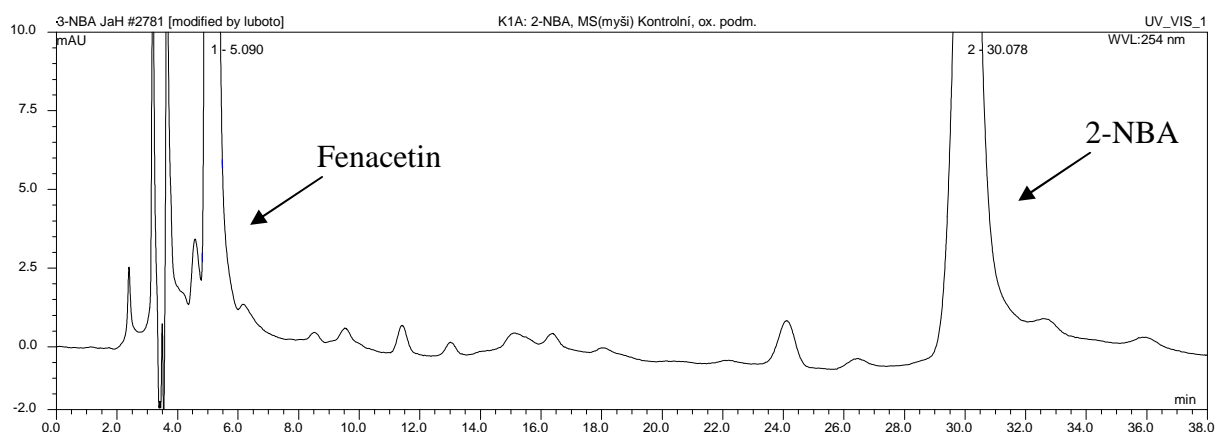
A**B****C**

Obr. 37 HPLC reakčních směsí získaných inkubací 2-NBA s jaterními mikrosomálními systémy myši za anaerobních podmínek: A: linie WT (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450, **B:** linie s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy, **C:** chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem myši linie WT bez přidání NADPH.

Složení inkubačních směsí viz kap. 3.3.2.2. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 μ l vzorku.

4.4.2 Studium metabolismu 2-NBA jaterními mikrosomálními systémy myši za aerobních podmínek

Ani v případě aerobních podmínek nebyl 2-NBA jaterním mikrosomálním systémem myši metabolizován. Žádné metabolity nebyly tvořeny ani jedním z používaných jaterních mikrosomálních systémů myši. (**Obr. 38, str. 75**).

A**B****C**

Obr. 38 HPLC reakčních směsí získaných inkubací 2-NBA s jaterními mikrosomálními systémy myši za aerobních podmínek: A: linie WT (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450, **B:** linie s delecí NADPH:cytochrom P450 reduktasy, **C:** chromatogram kontrolního vzorku získaný inkubací 2-NBA s jaterním mikrosomálním systémem myši linie WT bez přidání NADPH.

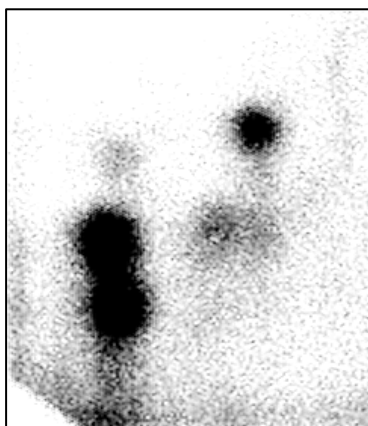
Složení inkubačních směsí viz kap. 3.3.2.1. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70% methanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel C18, teplota 35°C, detekce při 254 nm, aplikováno 20 µl vzorku.

4.5 Studium aktivace 3-NBA a 2-NBA jaterními mikrosomy potkanů a myší

4.5.1 Jaterní mikrosomy potkanů aktivují 3-NBA za tvorby aduktů s DNA

V další části diplomové práce jsme se zaměřili na poznání efektivity jaterních mikrosomálních systémů potkanů, a to jak nepremedikovaných žádným induktorem CYP (kontrolní mikrosomy), tak premedikovaných induktory těchto enzymů, redukčně aktivovat 3-NBA na reaktivní metabolity (intermediáty) tvořící adukty s DNA. Použity byly stejné mikrosomální systémy (kromě mikrosomů potkanů premedikovaných Sudanem I) jako při studiu metabolismu 3-NBA (viz kapitola 4.1). Adukty 3-NBA s DNA byly stanovovány pomocí metody „³²P-postlabeling“, jmenovitě versí, která pro intensifikaci detekce aduktů s DNA využívá n-butanol. [Stiborová *et al.* 2004b] Tato verze byla zjištěna v dřívějších pracích naší laboratoře jako metoda vhodná pro detekci a kvantifikaci aduktů tvořených v DNA aktivovaným 3-NBA (Stiborová *et al.* 2005a, 2006, 2008, 2009).

Všechny použité potkaní jaterní mikrosomy (mikrosomy kontrolních potkanů, potkanů premedikovaných β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem, PCN) aktivovaly za redukčních podmínek 3-NBA za tvorby pěti až šesti aduktů s DNA (tmavé skvrny na **Obr. 39, str. 77**).



Obr. 39 Adukty tvořené aktivací 3-NBA jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných PCN s DNA. Experimentální podmínky: 0.1 M Na fosfátový pufr pH 7,4, 10 μ M 3-NBA, 1 mM NADPH, 1 mg DNA telecího brzlíku, mikrosomy (1 mg proteinu). Adukty s DNA byly analyzovány pomocí metody „ 32 P-postlabeling“ (viz kapitola 3.3.6).

Tvořené adukty aktivovaného 3-NBA s DNA byly kvantifikovány a jejich množství vyjádřeno jako RAL („relative adduct labeling“ – množství aduktů na počet normálních nemodifikovaných deoxynukleotidů). Nejefektivnější v aktivaci 3-NBA na reaktivní metabolity tvořící adukty s DNA byly jaterní mikrosomy potkanů premedikované PCN a fenobarbitalem (**Tabulka 8**).

Tabulka 8 Množství aduktů 3-NBA s DNA tvořených jaterními mikrosomálními systémy potkanů za anaerobních podmínek. (MS – mikrosomy) Množství aduktů 3-NBA a směrodatné odchylky v tabulce byly určeny ze tří stanovení.

Jaterní mikrosomální systémy potkanů	Podmínky experimentu	RAL / 10^8 nukleotidů
		n-butanol
MS Kontrolní	anaerobní	$4,2 \pm 0,4$
β -NF-MS	anaerobní	$3,4 \pm 0,3$
PB-MS	anaerobní	$12,1 \pm 1,0$
EtOH-MS	anaerobní	$3,9 \pm 0,4$
PCN-MS	anaerobní	$15,9 \pm 1,3$

4.5.2 Jaterní mikrosomy myši aktivují 3-NBA za tvorby aduktů s DNA

Mikrosomy izolované z jater použitých myších modelů (WT a HRN) byly rovněž aktivní v reakcích vedoucích k aktivaci 3-NBA na metabolity (reaktivní intermediáty) tvořící adukty s DNA. Detekováno bylo opět pět až šest aduktů s DNA, obdobných jako v případě aduktů tvořených jaterními mikrosomy potkanů (**Obr. 39, str. 77**). Efektivita enzymů myších jaterních mikrosomů však byla prakticky o řád nižší než v případě mikrosomů jater potkanů (**Tabulka 9**).

Tabulka 9 Množství aduktů 3-NBA s DNA tvořených jaterními mikrosomálními systémy myši za anaerobních podmínek. (MS – mikrosomy) Množství aduktů 3-NBA a směrodatné odchylky v tabulce byly určeny ze tří stanovení.

Jaterní mikrosomální systémy myši	Podmínky experimentu	RAL / 10^8 nukleotidů
		n-butanol
MS Kontrolní (WT)	anaerobní	$0,66 \pm 0,05$
HRN MS	anaerobní	$0,54 \pm 0,05$

4.5.3 Studium aktivace 2-NBA jaterními mikrosomy potkanů a myši

Na rozdíl od 3-NBA, 2-NBA není jaterními mikrosomy potkanů a myši přeměňován na metabolity, které tvoří adukty s DNA. Žádné adukty s DNA nebyly v případě experimentů s 2-NBA detekovány.

5 DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo rozšíření poznatků o metabolismu dvou aromatických nitrosloučenin, 3-nitrobenzanthronu (3-NBA) a jeho izomeru 2-nitrobenzanthronu (2-NBA).

3-Nitrobenzanthron je jednou z polycyklických aromatických nitrosloučenin s vysokými toxickými účinky, který se vyskytuje ve složkách životního prostředí, je přítomný i ve výfukových plynech, byl také detekován v půdě a jeho výskyt byl prokázán i v dešťové vodě. [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008; Nagy *et al.*, 2005; Stiborová *et al.*, 2005a, 2006; Bieler *et al.*, 2007; Brocke *et al.*, 2008] Patří mezi nejsilnější mutageny, je karcinogenem pro hlodavce a také potenciálním karcinogenem pro člověka. [Arlt, 2005; Nagy *et al.*, 2005]

2-NBA je izomerem 3-NBA, který byl detekován ve znečištěném ovzduší v koncentracích výrazně vyšších než v případě 3-NBA. I když je 2-NBA ve srovnání s 3-NBA látkou slabě toxickou, [Arlt, 2005; Arlt *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2005], jeho vysoká koncentrace v ovzduší by však mohla představovat vysoké zdravotní riziko pro lidskou populaci.

V první části diplomové práce byl sledován potenciál enzymů mikrosomálního systému jater potkana metabolizovat 3-NBA za anaerobních a aerobních podmínek. Mezi tyto enzymy patří cytochromy P450 a také enzymy, které s cytochromy P450 spolupracují v MFO systému – NADPH:CYP reduktasa nebo NADH:cytochrom b₅ reduktasa.

Použití jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných různými induktory cytochromů P450 umožnilo odhadnout, jaké enzymy včetně cytochromů P450 skutečně participují na metabolismu 3-NBA v játrech. V experimentech byly použity jaterní mikrosomální systémy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat (potkanů) a jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných Sudanem I, β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN).

Výsledky experimentů signalizují, že 3-NBA je za anaerobních podmínek přeměňován na redukční metabolit 3-ABA jaterním mikrosomálním systémem potkanů nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450 (kontrolních) a jaterními mikrosomálními systémy potkanů premedikovaných β -naftoflavonem

a fenobarbitalem. Dále bylo zjištěno, že 3-ABA vzniká také v experimentech prováděných za aerobních podmínek, a to při použití jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných β -naftoflavonem. Množství stanoveného redukčního metabolitu 3-ABA z 3-NBA je však velmi malé, tvoří pouze 1 – 13% z množství parentální molekuly 3-NBA.

Z porovnání koncentrací 3-ABA (vypočítaných z kalibrační křivky standardu 3-ABA) tvořeného výše uvedenými jaterními mikrosomálními systémy potkanů vyplývá, že všechny tyto mikrosomy redukují 3-NBA s podobnou efektivitou. Nejefektivnější jsou jaterní mikrosomální systémy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, následují jaterní mikrosomální systémy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat a nejméně efektivní jsou mikrosomy jater potkanů premedikovaných β -naftoflavonem (**Tabulka 6, str. 62**).

Výsledky naznačují, že by za anaerobních podmínek mohly na redukcí 3-NBA za vzniku 3-ABA participovat cytochromy P450 2B1/2 indukované fenobarbitalem a cytochromy P450 1A1/2 indukované β -naftoflavon. Efektivita přeměňovat 3-NBA na jeho redukční metabolit 3-ABA je u obou forem cytochromů P450 podobná, nepatrně větší je v případě cytochromů P450 2B1/2. Je překvapivé, že i za aerobních podmínek je 3-NBA redukován. Na redukcí 3-NBA na 3-ABA se za těchto podmínek podílí pravděpodobně pouze cytochromy P450 podrodiny 1A. V dalších mikrosomálních systémech používaných v experimentech (CYP2E1 indukovaný ethanol a CYP3A1/2 indukované PCN) tvorba metabolitu 3-NBA, 3-ABA, nebyla detekována.

Překvapivým výsledkem však bylo zjištění, že 3-ABA nevznikal v experimentech s použitím jaterních mikrosomálních systémů potkanů premedikovaných Sudanem I, který je stejně jako β -naftoflavon induktorem CYP1A1/2.

Dále bylo v diplomové práci zjištěno, že za aerobních podmínek může být 3-NBA také oxidován. V experimentech byly detekovány dva „píky“ při separaci metabolitů 3-NBA pomocí HPLC, které signalizují pravděpodobnou tvorbu dvou oxidačních metabolitů 3-NBA. První metabolit byl od 3-NBA separován metodou HPLC v retenčním čase ~13 minut v experimentech s použitím kontrolních jaterních mikrosomálních systémů potkanů nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450 (kontrolních) a premedikovaných fenobarbitalem. Druhý metabolit byl eluován v retenčním čase ~18 minut v experimentech s použitím jaterních mikrosomálních

systémů kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných ethanolem a PCN. Identifikace, o jaké metabolity se jedná, bude předmětem dalších studií.

V druhé části diplomové práce byla sledována schopnost jaterních mikrosomálních systémů potkana metabolizovat 2-NBA za anaerobních a aerobních podmínek.

Získané výsledky signalizují, že 2-NBA pravděpodobně není metabolizován žádným používaným jaterním mikrosomálním systémem, a to v případě jak anaerobních, tak i aerobních podmínek, s výjimkou experimentů s použitím jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných β -naftoflavonem. Za použití tohoto systému byl za anaerobních podmínek detekován „pík“ v retenčním čase 7 minut. Identifikace, o jaký metabolit se jedná, bude předmětem dalších studií.

Ve třetí části diplomové práce byl sledován potenciál jaterních mikrosomálních systémů jiného organismu, jmenovitě myši, metabolizovat 3-NBA za anaerobních a aerobních podmínek. Pro pokusy byly použity myší linie s normální výbavou biotransformačních jaterních enzymů (linie WT) a myší linie s deficitem jednoho z těchto enzymů. Konkrétně „knock-out“ myši, s delecí NADPH:CYP reduktasy, donorem elektronů pro redukci cytochromů P450 v MFO systému (linie HRN). Geneticky modifikované „knock-out“ myši byly konstruovány v laboratořích spolupracujících institucí ve Velké Británii. [Henderson *et al.*, 2003]

Použití uvedeného modelu umožnilo odhadnout, jaké enzymy (cytochromy P450, NADPH:CYP reduktasa, NADH:cytochrom b_5 reduktasa) skutečně participují na metabolismu 3-NBA v játrech.

Z výsledků experimentů je patrné, že 3-NBA je jak za anaerobních, tak za aerobních podmínek redukován na 3-ABA oběma myšími experimentálními modely. Schopnost přeměňovat 3-NBA na 3-ABA jaterními myšími mikrosomy je však ve srovnání s jaterními mikrosomy potkanů nižší.

V pokusech prováděných za anaerobních podmínek podle očekávání vznikalo více redukčního metabolitu 3-NBA, 3-ABA, s použitím jaterního mikrosomálního systému myší linie WT (více než dvojnásobek) ve srovnání s myší linií HRN. I v experimentech prováděných za aerobních podmínek byla efektivita redukovat 3-NBA na 3-ABA vyšší v případě jaterního mikrosomálního systému myší linie WT. Rozdíl v množství vznikajícího 3-ABA však nebyl ve srovnání s použitím myší linie HRN tak patrný jako v případě anaerobních experimentálních podmínek.

Vysvětlit schopnost metabolizovat 3-NBA za vzniku 3-ABA myšími systémy s delecí NADPH:CYP reduktasy je obtížné. Jedním z možných vysvětlení by mohla být skutečnost, že v některých buňkách jaterní tkáně (vyjma hepatocytů) geneticky modifikovaných myších linií je NADPH:CYP reduktasa exprimována. V používaných jaterních mikrosomech je pak tento enzym v nižších koncentracích přítomný (~1-3% oproti kontrole). [Henderson *et al.*, 2003] Toto množství by mohlo být dostačující jak pro redukci 3-NBA, tak i pro poskytování elektronů cytochromům P450 a k efektivnímu fungování MFO systému. Další možností by mohla být schopnost nahradit funkci NADPH:CYP reduktasy enzymem NADH:cytochrom b₅ reduktasou, který je běžně funkční až při druhé redukci cytochromů P450 v reakčním cyklu MFO systému. Překvapivým výsledkem bylo zjištění, že za aerobních podmínek je efektivita redukovat 3-NBA na 3-ABA vyšší než v případě anaerobních experimentálních podmínek. Řešení všech těchto otázek bude předmětem dalších studií v naší laboratoři.

V další části diplomové práce byla sledována schopnost myších jaterních enzymů metabolizovat 2-NBA za aerobních a anaerobních podmínek.

Podle očekávání bylo zjištěno, že 2-NBA pravděpodobně není metabolizován žádným používaným jaterním mikrosomálním systémem, a to v případě aerobních i anaerobních podmínek.

V poslední části diplomové práce jsme sledovali efektivitu jaterních mikrosomálních systémů potkanů a myší aktivovat 3-NBA a 2-NBA za tvorby aduktů s DNA. Experimenty byly prováděny jednak s jaterními mikrosomy kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) a také s jaterními mikrosomy myších modelů WT a HRN a obou myších linií premedikovaných benzo(a)pyrenem (WT-BaP, HRN-BaP).

Z výsledků vyplývá, že všechny používané jaterní mikrosomální systémy potkanů aktivují 3-NBA za tvorby aduktů s DNA.

Z porovnání schopnosti různých jaterních mikrosomů potkanů tvořit adukty 3-NBA s DNA je patrné, že jaterní mikrosomální systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a PCN se podílí na redukci 3-NBA a v průběhu této reakce dochází ke tvorbě aduktů s DNA.

Nejefektivněji se na redukční aktivaci 3-NBA podílejí jaterní mikrosomy

potkanů premedikovaných PCN a fenobarbitalem. Vzhledem k tomu, že aktivita NADPH:CYP reductasy je v jaterních mikrosomálních systémech potkanů premedikovaných PCN a fenobarbitalem výrazně vyšší ve srovnání s aktivitou tohoto enzymu v jiných mikrosomech [Arlt *et al.*, 2003], zdá se, že v uvedených mikrosomech může redukovat 3-NBA spíše NADPH:CYP reductasa než cytochromy P450. Překvapivé bylo zjištění, že ačkoliv všechny použité potkaní mikrosomy redukčně aktivují 3-NBA, tvorba finálního redukčního metabolitu, 3-ABA, nebyla detekována v případech experimentů s některými z těchto mikrosomů.

Možným vysvětlením, rozdílů ve výsledcích experimentů sledujících tvorbu redukčního metabolitu 3-NBA, 3-ABA, a tvorbu aduktů 3-NBA s DNA, by mohla být produkce primárního redukčního metabolitu 3-NBA, N-OH-3-ABA, který je esenciální pro tvorbu aduktů, ještě před jeho další redukcí na 3-ABA detekovanou metodou HPLC. Může totiž též docházet k jeho rozpadu na nitreniové (karbeniové) ionty a k jejich vazbě na různé proteiny přítomné v různých mikrosomálních systémech.

Z myších modelů používaných ke sledování aktivačního metabolismu 3-NBA se na tvorbě aduktů s DNA podílely obě myší linie, WT a HRN. Efektivita enzymů myších jaterních mikrosomů však byla prakticky o řád nižší než v případě mikrosomů jater potkanů. Výsledky uvedené v diplomové práci potvrdily, že schopnost podílet se na redukčním metabolismu 3-NBA za vzniku 3-ABA je v případě jaterních mikrosomálních systémů myší menší ve srovnání s jaterními mikrosomálními systémy potkanů. 2-NBA nebyl jaterními mikrosomálními systémy potkanů a myší přeměňován za tvorby aduktů s DNA.

6 ZÁVĚR

Výsledky získané při řešení diplomové práce ilustrují, že cíle práce byly splněny. Nejdůležitější poznatky lze shrnout následovně:

- 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) je za anaerobních podmínek přeměňován na jeho redukční metabolit 3-ABA jaterním mikrosomálním systémem potkanů jak kontrolních (nepremedikovaných žádným induktorem cytochromů P450), tak premedikovaných β -naftoflavonem a fenobarbitalem.
- 3-Nitrobenzanthron je přeměňován na redukční metabolit 3-ABA též za aerobních podmínek, a to jaterním mikrosomálním systémem potkanů premedikovaných β -naftoflavonem.
- Jaterní mikrosomální systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a zvířat premedikovaných fenobarbitalem přeměňují za aerobních podmínek 3-NBA na metabolit eluovaný při HPLC v retenčním čase ~13 minut (metabolit X). Jeho struktura nebyla dosud určena.
- Jaterní mikrosomální systémy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a zvířat premedikovaných ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem (PCN) přeměňují za aerobních podmínek 3-NBA na metabolit eluovaný při HPLC v retenčním čase ~18 minut (metabolit Y). Jeho struktura nebyla dosud určena.
- 2-NBA pravděpodobně není metabolizován žádným používaným jaterním mikrosomálním systémem, a to v případě jak anaerobních tak i aerobních podmínek, s výjimkou experimentů s použitím jaterního mikrosomálního systému potkanů premedikovaných β -naftoflavonem. Za použití tohoto systému byl za anaerobních podmínek detekován „pík“ v retenčním čase 7 minut. Jeho struktura nebyla dosud určena.

- 3-NBA je jak za anaerobních, tak za aerobních podmínek redukován na 3-ABA jaterními mikrosomálními systémy myší linie WT („Wild Type“) a geneticky modifikovaných „knock-out“ myší, u kterých v játrech absentovala NADPH:CYP reduktasa („Hepatic Reductase Null“ - HRN).
- Žádný používaný jaterní mikrosomální systém myší netvoří metabolity 2-NBA, které by byly detekovány pomocí HPLC, a to ani v případě anaerobních ani aerobních podmínek.
- Jaterní mikrosomální systémy potkanů (mikrosomy kontrolních potkanů, potkanů premedikovaných β -naftoflavonem, fenobarbitalem, ethanolem a pregnenolon 16 α -karbonitrilem, PCN) aktivovaly za redukčních podmínek 3-NBA za tvorby až šesti aduktů s DNA. Nejeftektivnější v aktivaci 3-NBA na reaktivní metabolity tvořící adukty s DNA byly jaterní mikrosomy potkanů premedikované PCN a fenobarbitalem.
- Mikrosomy izolované z jater myších modelů (WT a HRN) také aktivovaly za redukčních podmínek 3-NBA za tvorby až šesti aduktů s DNA obdobných jako v případě aduktů tvořených jaterními mikrosomy potkanů. Efektivita enzymů myších jaterních mikrosomů však byla prakticky o řád nižší než v případě mikrosomů jater potkanů.
- 2-NBA nebyl jaterními mikrosomálními systémy potkanů a myší aktivován za tvorby detekovatelných aduktů s DNA.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Anzenbacher P., Anzenbacherová E.: Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 737-747 (2001)
2. Arlt V. M., Cole K. J., Phillips D. H.: Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B lymphoblastoid MCL-5 cells, *Mutagenesis*, **19**, 149-156 (2004)
3. Arlt V. M., Gingerich J., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Douglas G. R., White P. A.: Genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and 3-aminobenzanthrone in MutaTMMouse and lung epithelial cells derived from MutaTMMouse, *Mutagenesis*, **23**, 483-490 (2008)
4. Arlt V. M., Glatt H., Gamboa da Costa G., Reynisson J., Takamura-Enya T., Phillips D. H.: Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2-nitrobenzanthrone, *Toxicol. Sci.*, **98**, 445-457 (2007)
5. Arlt V. M., Glatt H., Muckel E., Pabel U., Sorg B. L., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferases, *Carcinogenesis*, **23**, 1937-1945 (2002)
6. Arlt V. M., Stiborová M., Henderson C. J., Osborne M. R., Bieler Ch. A., Frei E., Martínek V., Sopko B., Wolf C. R., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: Environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols, *Cancer Res.*, **65**, 2644-2652 (2005)
7. Arlt V. M., Stiborová M., Hewer A., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome P450 reductase, *Cancer Res.*, **63**, 2752-2761 (2003)
8. Arlt V. M.: 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence, *Mutagenesis*, **20**, 399-410 (2005)

9. Badyal D. K., Dadhich A. P.: Cytochrome P450 and drug interactions, *Indn. J. Pharmacol.*, **33**, 248–259 (2001)
10. Bieler Ch. A., Cornelius M. G., Stiborová M., Arlt V. M., Wiessler M., Phillips D. H., Schmeiser H. H.: Formation and persistence of DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in target and non-target organs after intratracheal instillation in rats, *Carcinogenesis*, **28**, 1117-1121 (2007)
11. Botts S., Ennulat D., Francke-Carroll S., Graham M., Maronpot R., Mohutsky M.: Introduction to hepatic drug metabolizing enzyme induction in drug safety evaluation studies, *Toxicol. Pathol.*, **38**, 796-798 (2010)
12. Brocke v J., Krais A., Whibley C., Hollstein M. C., Schmeiser H. H.: The carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone induces GC to TA transversion mutations in human *p53* sequences, *Mutagenesis*, **24**, 17-23 (2009)
13. Cohen S. M.: Carcinogenesis, Raven press, 171, New York (1978)
14. Coon M. J., Ding X., Pernecky S. J., Vaz A. D. N.: Cytochrome P450: progress and prediction, *FASEB J.*, **6**, 669 (1992)
15. Čechová T.: Mechanismus karcinogenních účinků nitroaromátů, polutantů přítomných v životním prostředí, Bakalářská práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2010)
16. Deichman W. B., MacDonald W. M., Coplan M. M., Woods F. M., Anderson W. A. D.: Para nitrobiphenyl, a new bladder carcinogen in the dog, *Ind. Med. Surg.*, **27**, 634 (1958)
17. Edwards R. J., Murray B. P., Singleton A. M., Boobis A. R.: Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmatic reticulum, *Biochemistry*, **30**, 71 (1991)
18. el-Bayoumy K., Shiue G. H., Hecht S. S.: Comparative tumorigenicity of 6-nitrochrysene and its metabolites in newborn mice, *Carcinogenesis*, **10**, 369 (1989)
19. Fu P. P.: Metabolism of nitro-polycyclic aromatic-hydrocarbons, *Drug Metab. Rev.*, **22**, 209 (1990)

20. Gonzales F. J., Gelboin H. V.: Human cytochromes P450: Evolution and cDNA-directed expression, *Environ. Health Persp.*, **98**, 81-85 (1992)
21. Gonzalez F. J., Crespi Ch. L., Czerwinski M., Gelboin H. V.: Analysis of human cytochrome P450 catalytic activities and expression, *Tohoku J. Exp. Med.*, **168**, 67-72 (1992)
22. Gonzalez F. J., Yu Ai-Ming: Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **46**, 41-64 (2006)
23. Goshman L., Fish J., Roller K.: Clinically significant cytochrome P450 drug interactions, *J. Pharm. Soc. Wis.*, 23-38 (2003)
24. Guengerich F. P.: Cytochrome P450 – Structure, mechanism and biochemistry, 3. vydání, Plenum Press, 387, New York (2005)
25. Guengerich F. P.: Characterization of human cytochrome P450 enzymes: *FASEB J.*, **6**, 745-748 (1992)
26. Henderson C. J., Otto D. M., Carrie D., Magnuson M. A., McLaren A. W., Rosewell I., Wolf C. R.: Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 13480 (2003)
27. Honkakoski P., Nigishi M.: Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors, *Biochem. J.*, **347**, 321-337 (2000)
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Cytochrome_P450_reductase (13.3.2012)
29. <http://is.muni.cz/el/1411/jaro2006/BVBC0322p/xenobiotika.06.ppt?fakulta=1411;obdobi=3282;kod=BVBC0322p> (13.3.2012)
30. <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/> (20.4.2012)
31. <http://metallo.scripps.edu/promise/HAEMMAIN.html> (13.3.2012)
32. <http://www.cchem.berkeley.edu/clarkgrp/GroupMembersPages/AlumniPages/MattTraylor.html> (20.3.2012)
33. <http://www.mou.cz/cz/co-jsou-nadory/article.html?id=174> (3.3.2012)
34. http://www.onkoforum.cz/prehledy/obecne_prehledy/jak_se_zjisti_a_jak_se_leci_nadorova.htm (3.3. 2012)
35. <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor> (3.3. 2012)
36. http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm (13.3.2012)

37. <http://www2.le.ac.uk/departments/biochemistry/staff/roberts/researchinterests/nadph-cytochrome-p450-reductase-and-electron-transfer-to-the-drug-metabolising-cytochromes-p450> (13.3.2012)
38. Hynie S.: Speciální farmakologie Díl VII/A, Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky, Karolinum, Praha (2003)
39. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí, *Chem. Listy*, **95**, 212-222 (2001)
40. IARC: Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes (Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans), *IARC*, **46** (1989)
41. Ingelman-Sundberg M.: Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms, *Arch. Pharmacol.*, **369**, 89-104 (2004)
42. Kitchin R. M., Bechtold W. E., Brooks A. L.: The structure-function relationships of nitrofluorenes and nitrofluorenones in the Salmonella mutagenicity and CHO sister-chromatid exchange assays, *Mutat. Res.*, **206**, 367 (1988)
43. Knejzlík Z., Káš J., Ruml T.: Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace, *Chem. Listy*, **94**, 913-918 (2000)
44. Kousalová L., Baranová J., Anzenbacher P.: Lékové interakce na úrovni cytochromů P450 – část I. – Interakce na úrovni CYP3A4, *Klin. Farmakol. Farm.*, **17**, 151-157 (2003)
45. Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D.: Barevný atlas farmakologie - druhé, přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing, spol. s r.o., Praha (2001)
46. Martínková J., Chládek J., Mičuda S., Cermanová J., Grim J.: Obecná farmakologie jako základ studia farmakologie experimentální a klinické, Olga Čermáková vydavatelství, Hradec Králové (2001)
47. Mestres J.: Structure conservation in cytochromes P450, *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, **58**, 596-609 (2005)
48. Nagy E., Adachi S., Takamura-Enya T., Zeisig M., Möller L.: DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air

- pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, *in vivo* and *in vitro*, *Mutagenesis*, **22**, 135-145 (2007)
49. Nagy E., Zeisig M., Kawamura K., Hisamatsu Y., Sugeta A., Adachi S., Möller L.: DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Carcinogenesis*, **26**, 1821-1828 (2005)
 50. National Toxicology Program. U.S. Department of health and human services: eight report on carcinogens (1998)
 51. Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Esrabrook R.W., Gonzales F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., Levin W., Philips J. R., Sato R., Waterman M. R.: The P450 superfamily – updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci, *DNA*, **8**, 1 (1989)
 52. Oprian D. D., Coon M. J.: Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH, *J. Biol. Chem.*, **257**, 8935-8944 (1982)
 53. Race P. R., Lovering A. L., Green R. M., Ossor A., White S. A., Searle P. F., Wrighton Ch. J., Hyde E. I.: Structural and mechanistic studies of *escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone, *J. Biol. Chem.*, **280**, 13256-13264 (2005)
 54. Reynisson J., Stiborová M., Martínek V., Gamboa da Costa G., Phillips D. H., Arlt V. M.: Mutagenic potential of nitrenium ions of nitrobenzanthrones: correlation between theory and experiment, *Environ. Mol. Mutagen.*, **49**, 659-667 (2008)
 55. Řemínek R.: Cytochromy P450, Bakalářská práce, PřF Masarykova univerzita, katedra biochemie, Brno (2006)
 56. Sabbioni G., Jones C. R., Sepai O., Hirvonen A., Norppa H., Järventaus H., Glatt H., Pomplun D., Yan H., Brooks L. R., Warren S. H., Demarini D. M., Liu Y. Y.: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**, 559-566 (2006)
 57. Samcová E.: Biotransformace cizorodých látek, přednáška na 3-LF UK, Praha, Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie (2010)

http://www.lf3.cuni.cz/miranda2/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CSFBXX41C/prednasky/es_xenobiochemie.pdf (13.3.2012)

58. Shirai T., Fysh J. M., Lee M. S., Vaught J. B., King C. M.: Relationship of metabolic activation of N-hydroxy-N-acylarylamines to biological response in the liver and mammary gland of the female CD rat, *Cancer Res.*, **41**, 4346 (1981)
59. Sotaniemi E. A., Arranto A. J., Pelkonen O., Pasanen M.: Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **61**, 331 (1997)
60. Stiborová M., Arlt V. M., Henderson C. J., Wolf C. R., Frei E., Schmeiser H. H., Phillips D. H.: Molecular mechanism of genotoxicity of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, **149**, 191-197 (2005a)
61. Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: Mechanism of formation and P-32postlabeling of DNA adducts derived from peroxidative activation of carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I), *Chem. Res. Toxicol.*, **8**, 489-498 (1995)
62. Stiborová M., Dračínská H., Hájková J., Kadeřábková P., Frei E., Schmeiser H. H., Souček P., Phillips D. H., Arlt V. M.: The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone and its human metabolite 3-aminobenzanthrone are potent inducers of rat hepatic cytochromes P450 1A1 and -1A2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1398-1405 (2006)
63. Stiborová M., Dračínská H., Martínková M., Mizerovská J., Frei E., Schmeiser H. H., Hudeček J., Hodek P., Phillips D. H., Arlt V. M.: The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone induces cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat lung and kidney, thereby enhancing its own genotoxicity, *Toxicology*, **247**, 11-22 (2008)

64. Stiborová M., Dračínská H., Martínková M., Mizerovská J., Hudeček J., Hodek P., Liberda J., Frei E., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Arlt V. M.: 3-aminobenzanthrone, a human metabolite of the carcinogenic environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone, induces biotransformation enzymes in rat kidney and lung, *Mutat. Res.*, **676**, 93-101 (2009)
65. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M., Hradec J.: Mechanism of formation and P-32postlabeling of DNA adducts derived from peroxidative activation of carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I), *Carcinogenesis*, **11**, 1843-1848 (1990)
66. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H.: Aristocholové kyseliny a ledvinové onemocnění „Chinese herbs nephropathy”, *Chem. Listy*, **94**, 186-189 (2000)
67. Stiborová M., Frei E., Wiessler M., Schmeiser H. H.: Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristocholic acids: Evidence for reductive activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2, *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1128 (2001)
68. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem. Listy*, **93**, 229-237 (1999)
69. Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem. Listy*, **98**, 876-890 (2004a)
70. Stiborová M., Mikšanová M.: Molekulární mechanismus kancerogeneze, *Živa*, **4**, 146 (1999)
71. Stiborová M., Patočka J., Frei E., Schmeiser H. H.: Biochemické a toxikologické aspekty etiologie balkánské endemické nefropatie, *Chem. Listy*, **99**, 782-788 (2005b)
72. Stiborová M., Rupertová M., Hodek P., Frei E., Schmeiser H. H.: Monitoring of DNA adducts in humans and ³²P-postlabelling methods, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **69**, 476-498 (2004b)
73. Stiborová M., Martínek V., Svobodová M., Šístková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V., Frei E., Schmeiser H. H., Phillips D. H., Arlt V. M.: Mechanisms of the different DNA adduct forming potentials of the

- urban air pollutants 2-nitrobenzanthrone and carcinogenic 3-nitrobenzanthrone, *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1192-1201 (2010a)
74. Stiborová M.: Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka, *Chem. Listy*, **96**, 784-791 (2002)
 75. Stiborová M.: Biochemie chemické karcinogeneze, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2010b)
 76. Stiborová M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, Sborník s multioborového semináře „Otevřená věda“, Praha (2005)
 77. Stiborová M.: Xenobiochemie, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2010c)
 78. Stratil P., Kubáň V.: Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách, *Chem. Listy*, **98**, 379-387 (2004)
 79. Šístková J.: Studium metabolismu vzdušných polutantů a mutagenů 3-nitrobenzanthronu a 2-nitrobenzanthronu, Diplomová práce, PřF UK, katedra biochemie, Praha (2007)
 80. Takamura-Enya T., Suzuki H., Hisamatsu Y.: Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones, *Mutagenesis*, **21**, 399-404 (2006)
 81. Tokiwa H., Sera N., Horikawa K., Nakanishi Y., Shigematu N.: The presence of mutagens carcinogens oin the excised lung and analysis of lung-cancer induction, *Carcinogenesis*, **14**, 1933 (1993)
 82. Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Zdravotnická ročenka České republiky 2010, str. 46 <http://www.uzis.cz/publikace/zdravotnicka-rocenka-ceske-republiky-2010> (3.3.2012)
 83. Vermilion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J.: Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 266-277 (1981)
 84. Voet D., Voetová J. G.: Biochemie, Victoria Publishing a.s., 227-228, Praha (1995)

85. Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S. S., Kim J-J. P.: Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 8411-8416 (1997)
86. Waxman D. J.: P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR, *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, 11 (1999)
87. White K. A., Marletta M.: Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein, *Biochemistry*, **31**, 6627 (1992)
88. Wiessler M.: DNA Adducts: Identification and biological significance, *IARC*, 165, Lyon (1994)